Aus dem Robert-Koch-Institut des Bundesgesundheitsamtes
(seinerzeitiger Leiter: Professor Dr. med. G. Henneberg)

UNTERSUCHUNGEN ÜBER BESTIMMTE POLARISATIONSOPTISC ERSCHEINUNGEN KALOTTENFÖRMIGER KOLONIEN VON BAC. CIRCULANS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lutz Johannes Foitzik
aus Burg

1973

Aus dem Robert Koch-Institut des Bundesgesundheitsamtes
(seinerzeitiger Leiter: Professor Dr.med.G. H e n n e b e r g)

UNTERSUCHUNGEN ÜBER BESTIMMTE POLARISATIONSOPTISCHE ERSCHEINUNGEN KALOTTENFÖRMIGER KOLONIEN VON BAC.CIRCULANS

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lutz Johannes Foitzik
aus Burg

Referent: Professor Dr.med. K.-E. G i l l e r t

Korreferent: Professor Dr.med. V. L e n k

UNIV. LEIDEN BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 3. Dezember 1973

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung und Problemstellung	1
II.	Material und Methoden	11
III.	Ergebnisse	15
	A. Versuchsergebnisse zum Ausschluß vorgetäuschter Doppelbrechung	15
	B. Unterscheidung zwischen optischer Anisotropie und optischer Aktivität	24
	C. Das Koloniewachstum auf modifizierten Nährböden und Ausschluß polarisationsoptisch wirksamer Nährbodenbestandteile als Ursachen der polarisationsoptischen Erscheinungen	28
	D. Das Verhalten von fixierten Bakterienkolonien bei polarisationsoptischer Untersuchung	34
	E. Das Rohprodukt der Extraktion	39
	F. Ergebnisse der durchgeführten Analysegänge	42
	G. Polarisationsoptische Untersuchungen an Einzelkeimen, insbesondere der Langformen von Bac.circulans	43
IV.	Diskussion	46
V.	Zusammenfassung	54
	Abbildungen	55
VI.	Literaturverzeichnis	66

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552710_0085

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Bemühungen, die Struktur von Bakterienkolonien näher kennenzulernen, waren bis zu dem Zeitpunkt der ersten Untersuchungen von Bakterienkolonien im polarisierten Licht ausgerichtet auf bestimmte bakteriologische Techniken und die Anwendung histologischer Aufarbeitungsverfahren. Das ist umso erstaunlicher, als es eine Zeitspanne in der biologischen Forschung gegeben hat, in der wesentliche Erkenntnisse über die Strukturen biologischer Objekte mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie gewonnen wurden und diese Zeit zusammenfiel mit den zahlreichen Bemühungen der Bakteriologen, genauere Kenntnis von der Struktur von Bakterienkolonien zu erlangen (HENNEBERG und MARWITZ (39)).
Jedoch keiner dieser Untersucher versuchte, diesem Strukturproblem mit einer zur damaligen Zeit hochaktuellen Technik - der Polarisationsmikroskopie - durch die Analyse bestimmter optischer Phänomene, welche Bakterienkolonien bei Betrachtung im polarisierten Licht zeigen können, näher zu kommen, obwohl es keineswegs an entsprechenden Hinweisen gemangelt hätte:

> So bemerkte 19o4 schon GRASSBERGER (36) bei der Untersuchung von Rauschbrand- und Ödembazillen einen eigentümlich metallischen Glanz an den Kolonien dieser Keimarten, wenn er diese im schräg durchfallenden Licht beobachtete.
>
> RUSS-MÜNZER (56) beschrieb 1938 die Kolonien von Wanderbazillen als bei makroskopischer Betrachtung "irrisierend".

Es erscheint an dieser Stelle sinnvoll, einen kurzen Überblick über die historische Entwicklung und die wichtigsten Erkenntnisse, welche die polarisationsoptischen Untersuchungen an biologischen Objekten ergaben, voranzustellen.

Die Doppelbrechung oder optische Anisotropie wurde erstmals 1669 von E.BARTHOLINUS (12) am Kalkspat beschrieben.

In der Folgezeit wurden die wichtigsten theoretischen Grundlagen erarbeitet und durch die Untersuchungen an Mineralien bestätigt.
Der glänzende Beweis für die Annahme, daß ein symmetrischer Raumgitterfeinbau der ein Mineral aufbauenden Atome ursächlich für das Zustandekommen der optischen Erschei - nungen im polarisierten Lichte sei, gelang v.LAUE 1912 mit Hilfe der Beugung von Röntgenstrahlen in Kristallen.

Doch schon relativ früh wurden polarisationsoptische Methoden auch dort angewendet, wo Strukturen vorlagen, deren kristallähnlicher Aufbau mikroskopisch nicht ohne weiteres nachweisbar war bzw. der Gedanke, daß es sich bei der Struktur bestimmter biologischer Objekte um kristallähnliche Ordnungen handeln könnte, abwegig erscheinen mußte. Die ersten im polarisierten Licht untersuchten biologischen Gebilde (Gallerten) waren tierischer und pflanzlicher Natur, die von MALUS (46) 1811 und von BREWSTER (14,15) 1814 und 1815 durchgeführt wurden.
Bereits Mitte des vorigen Jahrhunderts konnte dann VALENTIN (85) in einem Buch alle bei biologischen Gebilden bekannten polarisationsoptischen Erscheinungen zusammenfassend darstellen und durch eigene Untersuchungen ergänzen.
Nachdem eine Reihe von Untersuchungen vorlagen, drängte sich die Frage nach den Ursachen, die für die Doppelbre - chung bestimmter biologischer Objekte verantwortlich waren, auf. Dabei zeigte es sichm daß die Übertragung der durch polarisationsoptische Untersuchungen an Mineralien gewonnenen Erkenntnisse auf die Beobachtungen an biologischen Materialien von einer speziellen Problematik begleitet war: Es galt letztlich, schlüssig zu beweisen oder zu widerlegen, daß anisotrope biologische Objekte ähnlich wie die Kristalle der Mineralien strukturiert sein könnten. Die Ansichten der verschiedenen Untersucher gingen zeitweise weit auseinander, so daß es nicht weiter verwunderlich ist, daß zunächst mehrere Deutungsversuche diskutiert wurden:

v.EBENER (22) nahm an, daß für das Zustandekommen polarisationsoptischer Erscheinungen an sich isotroper Teilchen, die aufgrund ihres Wachstums nach verschiedenen Richtungen unterschiedlichen Spannungen ausgesetzt waren, ursächlich seien:
S p a n n u n g s h y p o t h e s e.
Dagegen vertraten ROUGET (55), BRÜCKE (18) und EHRENBERG (23,24) die Ansicht, daß die polarisationsoptischen Erscheinungen bei biologischen Materalien dadurch zustande kämen, daß feinste Lammellierungen und mikroskopisch nicht mehr zu erfassende Spalt- und Gitterbildungen durch Depolarisation des durchfallenden polarisierten Lichtes wirksam wären:
D e p o l a r i s a t i o n s h y p o t h e s e.
Die durch von NÄGELI und MOHL (zitiert bei SCHMIDT (58,59)) vertretene Theorie war schließlich diejenige Richtung, die dann späterhin ihre experimentelle Bestätigung fand. NÄGELI und MOHL postulierten die
M i c e l l a r h y p o t h e s e, deren Grundüberlegung die Annahme war, daß den aufbauenden Elementarteilchen eines polarisationsoptisch wirksamen biologischen Objektes kristallähnlicher Charakter zuzuschreiben wäre. Die solchermaßen beschriebenen Teilchen nannten sie Micelle und hielten deren Wirkungsweise im polarisierten Licht für eine physikalisch zu umschreibende Materialeigenschaft.

Klarheit innerhalb dieser zunächst sehr verschiedenen Auffassungen brachten die Untersuchungen AMBRONN's (2,4,5,6) und FREY's (26,27,28) in den Jahren 1919 bis 1926. Als Modellobjekt für ihre Studien dienten verschiedene gallertartige Stoffe, die sie vorwiegend aus tierischen Materialien gewannen. Aufgrund ihrer Versuche kamen sie zu dem Ergebnis, daß der zuvor pauschal verstandene Begriff der Doppelbrechung zu unterteilen sei: In Doppelbrechung als eine unveräußerliche Materialeigenschaft (und dies bedeutete gleichzeitig die Bestätigung der von NÄGELI und von MOHL vertretenen Micellarhypothese) und in Doppelbrechung, welche hervorgerufen wird, wenn bestimmte äußere Faktoren auf ein bestimmtes biologisches Objekt einwirken; sie bezeichneten diese Art von Doppelbrechung als "akzidentelle Doppelbrechung"oder "Texturdoppelbrechung". Die als Materialeigenschaft bezeichnete Art von Doppelbrechung wurde von ihnen auch "Eigendoppelbrechung" eines biologischen Materials genannt. Textur- und Eigendoppelbrechung wirken

entweder gleichsinnig oder gegensinnig und aus dem Wechselspiel dieser beiden Komponenten resultiert die ohne besondere Eingriffe im Polarisationsmikroskop sichtbare "Gesamtdoppelbrechung" eines optisch anisotropen biologischen Objektes.

> Die Erkenntnis, daß es eine Art von Doppelbrechung gibt, deren Erscheinen letztlich nur auf die Form der Einzelteilchen und deren Anordnung in einem Verband zurückzuführen ist (akzidentelle - oder Texturdoppelbrechung), war zunächst nur das Resultat logisch durchgeführter Versuche.
> Erst WIENER (89,9o,91) führte durch seine physikalisch-mathematischen Überlegungen und Rechnungen den Beweis für die Richtigkeit dieser Deutung. Ihm gelang die exakte Beschreibung der Form der Einzelteilchen (anisodiametrische Stäbchen oder Plättchen) und der Bedingungen (geordnete Ausrichtung der Stäbchen oder Plätt - chen, unterschiedlicher Brechungsindex von diesen und dem sie umgebenden Material) desjenigen Körpers - des von ihm als "idealen Mischkörper" bezeichneten Gebildes - welcher Texturdoppelbrechung zeigen kann. Anstelle der Bezeichnung "Texturdoppelbrechung" setzte er den Begriff von der "Formdoppelbrechung".
> WIENER hatte den "idealen Mischkörper" als ein Zwei-Komponenten-System beschrieben; eine Erweiterung erfuhr diese Begriffsbestimmung 1938 durch SCHMITT (75, 76) und 1957 durch THORNBURG (81). Die wesentliche Erkenntnis beider Untersucher bestand darin, daß sie nachweisen konnten, daß die Formdoppelbrechung nicht nur durch einen Mischkörper bestehend aus nur zwei Komponenten zustande kommen kann, sondern, daß auch mehr als zwei Komponenten, allerdings auch nur unter den von WIENER erkannten Kriterien, einen Mischkörper bilden können. Von den WIENERschen Formeln ausgehend erfuhr auch diese Erweiterung der Mischkörpertheorie durch diese beiden Untersucher ihre exakte mathematische Erfassung.

Damit waren die wichtigsten theoretischen Grundüberlegungen und Begriffsbestimmungen getan, die auch heute noch allen polarisationsoptischen Arbeiten zugrunde liegen. AMBRONN und FREY nutzten bei ihren Arbeiten konsequent die von WIENER erkannten und berechneten Grundlagen und betrachteten die polarisationsoptischen Erscheinungen biologischer Objekte (Gesamtdoppelbrechung) als das mögliche Zusammenwirken von Formdoppelbrechung (Texturdoppelbrechung), welche Aus-

druck des submikroskopischen Feinbaues eines WIENER'schen Mischkörpers ist, und Eigendoppelbrechung, welche eine spezifische Eigenschaft des amikroskopischen Feinbaues der einen Mischkörper aufbauenden (Stäbchen oder Plättchen von anisodiametrischer Form) Elementarteilchen sein kann.
Die Auffassung, daß bestimmte biologische Materialien Eigendoppelbrechung zeigen können, wurde, ähnlich wie in der Mineralogie, durch die Ergebnisse der einige Zeit später durchgeführten Röntgenfaserdiagramme (7,8,9) bestätigt. Mit Hilfe dieser Untersuchungen war es möglich, den raumgitterartigen Feinbau, der den polarisationsoptisch wirksamen Einzelelementen biologischen Materials zugrunde liegt, nachzuweisen. So entstanden durch die Zusammenarbeit der verschiedensten Untersuchungsverfahren (16,17,44,47,48,49,78,79) genaue Vorstellungen über die Struktur verschiedener Eiweißkörper. SCHMIDT (74), der sich besonders dem Studium der aus Eiweißbausteinen gebildeten Fibrillen widmete, beschreibt diese wie folgt:

> "Die Molekeln der Eiweißkörper der wichtigsten Gewebebausubstanzen sind lange Ketten, die aus Aminosäureresten in peptidischer Bindung zusammengefügt sind. Diese "Hauptvalenzketten" (Fadenmolekeln) lagern sich bei den einfachsten, fibrillären Strukturen parallel zusammen, so daß letzten Endes die Fibrillenform auf die Gestalt der Molekeln zurückgeht. Der Zusammenhalt in der Länge der einzelnen Ketten beruht auf der chemischen Bindung der aufbauenden Atome (Hauptvalenzen), in einzelnen Fällen auch auf Querverbindungen durch Primärvalenzen. Damit hängt zum Teil die Verschiedenheit der Kohäsion in der Quer- und Längsrichtung zusammen, auf welcher Spaltbarkeit vieler Fibrillen beruht".

Eines der wichtigsten Fundamente für die Strukturanalyse biologischen Materials war damit gelegt und gleichzeitig waren Impulse gegeben einerseits für die Weiterentwicklung der Polarisationsmikroskopie und andererseits für die Ausdehnung der Anwendung der polarisationsmikroskopischen Untersuchungen auf fast alle Bereiche des biologischen Sektors. Letzteres wurde besonders durch den Umstand begünstigt, daß es mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie möglich war, lebende oder überlebende, zunächst ohne tief eingreifende präparatorische Eingriffe artifiziell veränderte Ob-

jekte, zu untersuchen - ein eminent wichtiger Vorteil, den diese Methodik vielen anderen voraus hatte und hat.

Die Literatur aus dieser Zeit (192o bis 1945) spiegelt deutlich diese Entwicklung wider; und es liegen uns vor allem durch die umfangreichen Arbeiten J.W.SCHMIDT's (58-69) ausführliche Übersichten über den jeweiligen Stand der Strukturanalysen an biologischen Objekten vor. Neben diesen Darstellungen enthalten sie aber auch gleichzeitig Berichte über den Entwicklungsstand der Gerätschaften für die Polarisationsmikroskopie, als auch die Zusammenstellung der Ergebnisse polarisationsmikroskopischer Untersuchungen aus anderen Fachbereichen (z.B.Kunststoffchemie). Der Vollständigkeit halber müssen aber auch die Arbeiten von BOEHM (13) über die Methoden zur Untersuchung von Strömungsdoppelbrechung, die allgemeinen Darstellungen KÖHLER's (43) und AMBRONN's(2,6) über die Anwendungsbereiche des Polarisationsmikroskopes innerhalb der Biologie und die zusammenfassenden Arbeiten von FREY-WISSLING (29,3o,31) über die submikroskopische Struktur des Protoplasma und seiner Bestandteile, erwähnt werden.
Überblickt man so den größten Teil der älteren Literatur, dann muß der Eindruck entstehen, daß während dieser Zeit fast alles, was sich nur irgendwie für die mikroskopische Betrachtung verwenden ließ, polarisationsmikroskopisch untersucht worden sei. Und doch ist ein Bereich der Biologie fast gänzlich ausgespart geblieben: die Mikrobiologie (mit Ausnahme der Protozoen). Diese Tatsache erklären zu wollen, würde wohl nur spekulativ möglich sein, und wir wollen diesem Umstand deshalb nicht weiter nachgehen. Die Ausbeute nach der Durchsicht dieser älteren Literaturstellen im Hinblick auf bakteriologische Fragestellungen ist sehr gering und Schlußfolgerungen waren den betreffenden Untersuchern kaum möglich: AMANN (1) prüfte schon 1893 Bakterienfärbun-

gen auf Dichroismus (Doppelabsorption)[+]. Er konnte dabei beobachten, daß mit Malachitgrün angefärbte Milzbrandbakterien ein solches Phänomen zeigen können; ebenfalls dichroitische Erscheinungen fand er, wenn auch beträchtlich weniger gut ausgeprägt, nach der Gramfärbung und der Färbung mit Methylenblau.
RHUMBLER (53) beobachtete bei polarisationsoptischen Untersuchungen von Foraminiferen bakterienförmige Stäbchen von 3 - 12 µ Länge, die teilweise Doppelbrechung zeigten, wobei nicht zu entscheiden war, ob diese doppelbrechenden Eigenschaften schon vor der Versteinerung oder erst sekundär durch diesen Prozeß hervorgerufen worden waren.

In der neueren Zeit wurden neue Techniken zur Strukturuntersuchung biologischer Objekte entwickelt, die es erlaubten, einen bedeutend weitergehenden Einblick in diese Zusammenhänge zu erlangen, als es jemals die Polarisationsmikroskopie, deren Grenze im wesentlichen mit dem Auflösungsbereich der Lichtmikroskope schlechthin zusammenfällt, hätte erreichen können (Röntgenbeugungsdiagramme, Elektronenmikroskopie, Biochemie).
Die große Zeit der Polarisationsmikroskopie war damit beendet; das soll jedoch nicht heißen, daß sie vollkommen vergessen wurde. Die Literatur aus der Zeit nach 1945 spiegelt denn auch diese Entwicklung wider. Sie ist dadurch gekennzeichnet, daß weniger überraschend neue Anwendungsbeispiele oder neue theoretische Erkenntnisse gefunden wurden, sondern daß die Polarisationsmikroskopie langsam ihren festen Platz in den Handbüchern und Monographien über mikroskopische Nachweismethoden erhält. In erster Linie ist es wieder SCHMIDT (7o-74), der in großen Arbeiten die Dar - stellung aller neueren Ergebnisse fortführt und im Rahmen

---

[+] Dichroismus = Doppelabsorption ist die Eigenschaft bestimmter anisotroper Materialien, den außerordentlichen oder ordentlichen Lichtstrahl in unterschiedlichem Grade zu absorbieren.

großer Nachschlagewerke Techniken, Verfahren, Geräte und Zubehör für die Polarisationsmikroskopie zusammengestellt.

Weiterhin sind PFEIFFER (52), BURRI (19) und HALLIMOND (38) zu nennen, die in ihren Handbüchern über mikroskopische Nachweisverfahren und Techniken der Polarisationsmikroskopie einen entsprechenden Platz eingeräumt haben. In einer Monographie widmet FREY-WISSLING (29) einem besonderen Abschnitt den physikalischen Eigenschaften des Protoplasmas, und in diesem Zusammenhang werden auch polarisationsoptische Phänomene behandelt. Schließlich soll noch BARTELS (11) erwähnt werden, der innerhalb einer Sammlung von quantitativen Nachweismethoden in der Histochemie über optische Methoden zur Analyse der Struktur biologischen Materials berichtet, wobei besonders neuere Ergebnisse über dichroitische Färbungen und dafür brauchbare Farbstoffsubstanzen hier hervorgehoben seien.
In diesen zwischen 1945 und 196o erschienenen Arbeiten fand sich nur ein knapper Hinweis von SALTON und HORNE (57) über das Verhalten von präparierten Bakterienzellwänden im Strömungsapparat: Die Verfasser beobachteten an den von ihnen isolierten Zellwänden von E.coli, Str. faecalis und S.pullorum Strömungsdoppelbrechung[+]. Leider ist diese Beobachtung in der zitierten Arbeit nur eine Randbemerkung, auf welche die Autoren nicht weiter eingehen und die sie auch in ihren später erschienenen Arbeiten anscheinend nicht weiter verfolgt haben.

Im Jahre 1958 benutzte GILLERT (32) erstmals polarisiertes Licht zur Beobachtung von Bakterienkolonien und konnte bestimmte optische Phänomene registrieren.

[+] Strömungsdoppelbrechung ist das passive Ausrichten (Orientierung) entweder optisch isotroper aber anisodiametrischer Einzelteilchen in einem Zwischenmedium (besondere Art der Formdoppelbrechung) oder optisch anisotroper Teilchen in einer Strömung.

In einer weiteren Arbeit, die sich mit diesen Erscheinungen beschäftigt, untersucht GILLERT (33) die Kolonien verschiedener Keimarten (Bac.circulans, Micrococcus aureus, Proteus vulgaris, Bac.athracis) und kommt zur Unterscheidung von "optisch aktiven" und optisch inaktiven" Kolonien in gewisser Abhängigkeit von deren Auftreten in R- oder S-Form. Bei der Untersuchung der beweglichen Kolonien von Bac.circulans wird deren Verhalten im polarisierten Licht von ihm wie folgt beschrieben:

> "Die rotierenden kuppelförmigen Kolonien des von uns angezüchteten und eingehender untersuchten Modellstammes "Tegel" zeigen zwischen gekreuzten Polarisationsfiltern typische Sphäritenkreuze.
> Die rotierenden Richtkolonien zeigen, entsprechend ihrer Entstehung aus rotierenden kuppelförmigen Kolonien, Strukturen wie deren Randpartien.
> Aus mikrokinematographischen Untersuchungen im polarisierten Licht ging hervor, daß die relative Lagerung der Stäbchen in einer rotierenden Kolonie stundenlang erhalten bleiben kann.
> Strukturen von rauhen Kolonien lassen sich im polarisierten Licht gut erfassen".

1963 dehnte GILLERT (34) seine Beobachtungen von Bakterienkolonien im polarisierten Licht, neben der Beobachtung von Bac.circulans - Kolonien, auf solche von Shigella sonnei (rauh), S.paratyphi B und einen nicht näher differenzierten Keim aus der Pseudomonasgruppe aus. Aufgrund seiner Untersuchungen faßt er zusammen:

> "1. Die Kolonien verschiedener Mikrobenarten sind optisch aktiv.
> 2. Die optische Aktivität hängt bei Kolonien aus stäbchenförmigen Mikroorganismen von der Lagerung der Stäbchen und von der Anzahl der übereinanderliegenden Schichten ab.
> 3. Die Untersuchungen zwischen gekreuzten Polarisationsfiltern zerstört die Kolonien nicht und gestattet die stunden- und nötigenfalls tagelange Beobachtung der erkennbaren Strukturen".

Als mögliche Ursache der optischen Phänomene werden aufgezählt:

1. Die Kolonie wirkt als WIENER'scher Mischkörper.
2. Die Einzelbakterien scheiden einen "optisch aktiven" Stoff als Stoffwechselprodukt aus, der Eigendoppelbrechung zeigt.
3. "Optisch aktive" Substanzen des Nährbodens erfahren

eine Anreicherung innerhalb der Kolonie.
4. Die Faserstruktur der Geisseln.
5. Die Bakterienzellwand als Ursache der "optischen Aktivität".

Die beobachteten polarisationsoptischen Phänomene werden beschrieben, z.T. photographisch dargestellt. Die Untersuchungen erfolgten zwischen gekreuzten Polarisationsfiltern, wodurch eine nähere Charakterisierung der beobachteten polarisationsoptischen Erscheinungen nicht möglich war. Es wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, daß die relative Lagerung der Einzelkeime innerhalb des Kolonieverbandes ursächlich für das Zustandekommen der beobachteten polarisationsoptischen Bilder sei.

Damit ergeben sich für die hier vorliegende Arbeit folgende Aufgabenstellungen:

1. Herauszufinden, inwiefern die beobachteten polarisationsoptischen Erscheinungen auf
   a) vorgetäuschte Doppelbrechung
   b) optische Anisotropie
   c) optische Aktivität als Sonderfall des Verhaltens optisch isotropen oder optisch anisotropen Materials

   zurückzuführen ist.

2. Im Falle des Vorliegens von Doppelbrechung (optischer Anisotropie) als Ursache der polarisationsoptischen Bilder versuchen
   a) die optischen Phänomene näher zu charakterisieren
   b) die Ursachen dieser Erscheinungen durch das Auffinden der hierfür verantwortlichen in der Bakterienkolonie enthaltenen Komponente(n)

   herauszuarbeiten.

Hinsichtlich der polarisationsoptischen termini technici folgen wir den Vorschlägen MOSBACH's (5o), der sich in seiner Arbeit um eine sinnvolle und begründete Verwendung bestimmter Fachausdrücke bemüht hat.

II. MATERIAL UND METHODEN

Keimart

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde der Stamm Bac. circulans ATCC 9966 ausgewählt.

Kulturbedingungen:

Nährmedien: Nähr-Agar. Zusammensetzung: loo ml Aqua dest.; 2 g japanischen Fadenagar; 1 g Pepton St.; 1,4 g Lab.Lemco Powder; o,3 g Kochsalz.

Zum Ausschluß polarisationsoptisch wirksamer Bestandteile der Nährmedien wurden modifizierte Nährböden hergestellt. Dabei blieb es bei der oben beschriebenen mengenmäßigen Zusammensetzung; anstelle des japanischen Fadenagars wurde jedoch gereinigte Agarose[+)] verwandt und durch das systematische Fortlassen einzelner Bestandteile bis zu einem Nährboden, der nur noch aus Agarose und Aqua dest. bestand, die angestrebte Modifizierung erreicht.

Das Ausgießen des Agars erfolgte anstelle von Petrischalen auf mit Glasringen versehene ebene und spannungsfreie Glasplatten; Abdecken nach Erstarren des Agars mit einer Glasplatte.

Vortrocknen der Platten für zwei Stunden im Brutschrank bei +37°C (GILLERT (35)).

Abimpfen mit einer Platin-Öse, Inkubation für 2o bis 24 Stunden im Brutschrank bei +37°C.

Mikroskopische Ausrüstung und Photographie

Ultraphot-Photomikroskop[++)] mit Polarisationszusatzeinrichtung (Zeiss): Spannungsfreie POL-Objektive, spannungsfreier POL-Kondensor mit ausklappbarer Frontlinse

---

[+)] Firma: L-Industrie Biologique, Francaise S.A., Genevilliers/Seine

++) Firma Carl Zeiss, Oberkochem

(Apertur 1,3) drehbarer, in bestimmten Stellungen einrastender Polarisator, drehbarer Analysator mit Gradeinteilung, monocularer Achsenbildertubus, Polarisationsdrehtisch mit Gradeinteilung und polarisationsoptische Hilfsobjekte: Gipsplättchen Rot I.Ordnung, Quarzkeil I - III Ordnung, 1/4λ Glimmerplättchen und zur Untersuchung mit zirkular polarisierten Licht zwei 1/4λ Glimmerplättchen mit zueinander gekreuzten Hauptschwingungsrichtungen mit dazugehörigem PIL Filter 546 nm.
Lichtquellen: Niedervoltleuchte, Quecksilberhöchstdrucklampe HBO 2oo (Zeiss).
Photographie: Plattenmaterial (9 x 12), Graphic - Negativ Planfilm und Kunstlicht - Color Planfilm (Agfa).
Immersionsmedium: Immersionsöl nD_{20}^{o}: 1,515 (Zeiss).

Photometrie und Brechungsindexbestimmung

Photometer: PMQ II (Zeiss)
Brechungsindexbestimmung: Abbè'sches Refraktometer (Zeiss)
Einbettungsmedium f.biologische Objekte nach BARER und JOSEPH (1o% Rinderalbumin der Fraktion V [+]).
Kriterium für die Brechungsindexbestimmung von biologischen Strukturen im Mikroskop: BECKE-Methode und Phasenkontrast-Methode.

Chemisch fixierende Behandlung von Kolonien in toto

Fixierung: Carnoy'sche Flüssigkeit (abs.Äthanol, Chloroform, Eisessig im Verhältnis 6o:3o:1o), 1o % neutrales gepuffertes Formol, ges.Phosphorwolframsäure in 7o % Äthanol.

Methoden:
a) Gefriersubstitution in abs.Äthanol bei -7o°C
b) Fixation bei -4°C nach Vorbehandlung der unfixierten Objekte für 1o - 15 min bei -12°C.
c) Objektträgerfixation von Kolonie-Abklatschpräparaten zur Beobachtung der Fixationsvorgänge.

[+] Bovine Albumin Powder, Fraction V from Bovine Plasma; Armour Pharmaceutic Comp. Chicago

Extraktionsgang der "Substanz C"

In Anlehnung an FORSYTH und WEBLEY (25).

Ausgangsmaterial 2oo für 24 Stunden bebrütete Nähr-Agar-Petrischalen mit Bac.circulans ATCC 9966.

Methodik:

a) Abschwemmen der Keime mit 2,5 ml Aqua dest./ Petrischale

b) Einengen der wässrigen Bakterienaufschwemmung im Rotationsverdampfer bei 37°C auf ein Endvolumen von 5o ml

c) Zugabe von 4 Teilen abs.Äthanol + 2 % Eisessig. Schütteln dieser Aufschwemmung

d) Abzentrifugieren des Überstandes bei 75oo bis 8ooo g. Abheben des Überstandes

e) Waschen des Sedimentes mit abs.Äthanol. Wiederholen von d)

f) Aufnehmen des Präzipitates in 5o ml Aqua dest. Wiederholen von d)

g) Überstand weiterverarbeiten wie unter c) bis e)

h) Zweimaliges Waschen des Präzipitates mit Äther. Trocknenlassen des Präzipitates

i) Aufnehmen des Präzipitates mit lo ml Aqua dest.

j) Sterilfiltration dieser wässrigen Lösung zum Entfernen noch vorhandener korpuskulärer Bestandteile. Durchgeführt als Saugfiltration.

Vorversuche zur Analyse der "Substanz C"

1. Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl, Phosphorbestimmung nach MARTIN und DOTY.

2. Papierchromatographische Spot-Teste:

   a) zum Nachweis freier Aminosäuren:Ninhydrinreaktion

   b) zum Nachweis von Polysacchariden: Anfärbung mit Karminrot (94)

   c) zum Nachweis von sauren Mucopolysacchariden: Anfärbung mit Toluidinblau (94)

3. Hydrolyse der "Substanz C":

   Erfolgte in 3 n HCl bei loo°C im Rücklauferhitzer für

eine Stunde. Entfernen der HCl bis zur neutralen Reaktion des Hydrolysates im Rotationsverdampfer bei 2o°C durch laufende Zugabe von Aqua dest.

4. Aufarbeiten des Hydrolysates:

   a) Nachweis freier Monosaccharide durch aufsteigende Papierchromatographie[+]. Laufgemisch: Methyl-Äthyl-Keton/Methanol/Eisessig (5o:4o:1o), Sprühreagenz nach TOLLER und ZAFFARONI (94). Entwicklung der Streifen bei 1oo°C für 1o - 13 min. Fixierung der Streifen in Natriumthiosulfat, 2 % Essigsäure, Leitungswasser zum Spülen.

      Dünnschichtchromatographie: Trägermaterial Kieselgel, Laufgemische wie unter 4a) angegeben. Sprühreagenzien: Naphtoresorcin (94) und Anthron-Reagenz. Entwicklung der Platten bei 1oo°C für 1o - 15 min.

   b) Nachweis freier Aminosäuren: Dünnschichtchromatographie. Trägermaterial Kieselgel. Laufgemisch: Butanol/Eisessig/Aqua dest. (8o:2o:2o), Sprühreagenz Ninhydrin, Entwicklung der Platten bei 1oo°C für 1o - 15 min.

5. Nachweis von UV-absorbierenden Aminosäurefraktionen durch Dünnschichtchromatographie: Trägermaterial Kieselgel HF 21 mit Leuchtstoffzusatz; Technik wie unter 4b).
   UV-Bestrahlung.

[+] Benutzt wurden die Papiere Nr.3,7 und 8 der Firma Whatman

III. ERGEBNISSE

Der Nachweis, daß es sich bei den polarisationsoptischen Erscheinungen der Kolonien von Bac.circulans um Doppelbrechung handelt, konnte bisher noch nicht erbracht werden. Es stellt sich somit als erstes die Aufgabe, zu versuchen, einen solchen Beweis zu führen.
Zu Beginn dieser Untersuchungen wurde zunächst versucht, alle die Komponenten der Untersuchungsobjekte, die zu einer Vortäuschung von Doppelbrechung geeignet sind, herauszufinden, um sie nach Möglichkeit auszuschalten. Bei dem von uns untersuchten Objekt-System: Glasplatte - Agar - kalottenförmige Kolonie kommen als eventuell störende Faktoren infrage:

a) Unebenheiten, Verspannungen oder chemikalische Beimengungen der Glasplatten.
b) Gerichtete Orientierung der Agar-Fadenmolekeln, entstanden durch einseitigen Druck oder Zug.
c) Reflexionsvorgänge an den gekrümmten Oberflächen der kalottenförmigen Kolonien, ähnlich den Erscheinungen an Linsen hoher Apertur.
d) Depolarisationserscheinungen, bedingt durch mikroskopisch feine "Gitterstrukturen"der Objekte.

A. Versuchsergebnisse zum Ausschluß vorgetäuschter Doppelbrechung.

a) Untersuchungen der verwendeten Glasplatten:
Die von uns benutzten Glasplatten wurden von einer speziell mit den Problemen der optischen Wirkung von Gläsern vertrauten Berliner Firma hergestellt. Es wurde darauf geachtet, daß nur farbloses Glasmaterial verwendet wurde, da bekannt ist, daß bestimmte chemische Beimengungen, wie sie fast regelmäßig bei Gläsern minderer Qualität auffällig, durch einen meistens grünlichen Farbton (Eisensalzverbindungen),

beobachtet werden können, uncharakteristische Aufhellungen im linear polarisierten Licht bei der Untersuchung zwischen gekreuzten Polarisations-Filtern hervorrufen können. Alle gelieferten Glasplatten wurden vor der Verwendung der Platten im Polarisationsmikroskop mit einem Pol-Objektiv kleiner Maßstabzahl auf das Vorhandensein störender Beimengungen untersucht.
Bei der Herstellung von Tafelglas ist es oft unvermeidlich, daß innerhalb des Glases Verspannungen auftreten oder daß die Glasplatten nicht vollkommen planparallel ausfallen. Die Prüfung auf das Vorliegen von Glasverspannungen wurde ebenso wie die Überprüfung der Planparallelität der Platten von der Herstellerfirma inteferenzoptisch vorgenommen.
Da die Glasplatten nach jeder Benutzung sorgfältig gereinigt werden mußten und im Anschluß daran hitzesterilisiert wurden, bestand die Möglichkeit, daß durch thermische Einflüsse nachträglich im Glase Verspannungen auftraten. Um diese auszuschließen, wurde jede Glasplatte, bevor sie erneut mit Nähr-Agar beschickt wurden, im Polarisationsmikroskop abgesucht und gegebenenfalls aussortiert.

b) Untersuchungen des erstarrten Agar-Nährbodens:
Der auf den mit Glasringen versehenen Glasplatten ausgegossene und danach erstarrte Agar-Agar zeigte für gewöhnlich keine auffälligen optischen Erscheinungen. Es kam jedoch hin und wieder vor, daß die Nährböden, die länger als zwei Stunden im Trockenschrank bei +37°C vorgetrocknet worden waren, bei ihrer Untersuchung im Polarisationsmikroskop zwischen gekreuzten Polarisations-Filtern bei einer Tischumdrehung von 36o° Aufhellungsbezirke zeigten, so daß in solchen Bezirken gewachsene kalottenförmige Kolonien ihr polarisationsoptisches Bild änderten (Abb.1 a-c). Diese

Erscheinungen können am ehesten dadurch erklärt werden, daß durch einen forcierten Trockenvorgang der Nährböden Gebiete mit gerichteten Agar-Molekeln auftreten können, die hinsichtlich ihrer optischen Erscheinungen ähnlich denen sind, die beobachtet werden können, wenn ein Streifen Agar in einer bestimmten Richtung gedehnt oder ein gerichteter Druck ausgeübt wird (SCHMIDT (6o,72,73)).

c) Untersuchungen über die Reflexionsvorgänge an den gekrümmten Oberflächen kalottenförmiger Kolonien:

Jeder Brechungs- oder Reflexionsvorgang an transparenten und semitransparenten Körpern und deren Oberflächen kann zu einer Beeinflussung der Schwingungsrichtung des durchfallenden Lichtes führen. Dadurch kann es bei der Beobachtung im linear polarisierten Licht zwischen gekreuzten Polarisations-Filtern zu Aufhellungsbezirken kommen, die Doppelbrechung verdecken oder vortäuschen können. Solchen Erscheinungen ist gemeinsam, daß die Intensität zwischen gekreuzten Polarisations-Filtern proportional zu $\sin^2 2\chi$ ist, wenn χ der Winkel zwischen der ursprünglichen Schwingungsrichtung (Polarisator) und Einfallsebene bei der Brechung bzw. Reflexion bedeutet. Damit bleibt also die Intensität zwischen gekreuzten Polarisations-Filtern nur dann Null, wenn $\chi = 0$ oder 90° ist, sie ist am meisten für diejenigen Einfallsebenen verändert, für welche $\chi = \pm 45^\circ$ ist (RINNE-BEREK (54)). Diese Wirkung läßt sich mühelos an nicht für polarisationsoptische Zwekke gefertigte Linsen, z.B.Objektiven mit hoher Apertur, die eine starke Krümmung ihrer Oberflächen aufweisen, demonstrieren.

Um eine möglicherweise vorhandene "Linsenwirkung" der Oberfläche kalottenförmiger Kolonien auszuschalten, mußte auf vorsichtige Art und Weise versucht werden, deren gewölbte Oberfläche unter polarisationsoptischer

Beobachtung zu verändern, um die Bilder vor und nach einer solchen Behandlung zu vergleichen. Dies konnte durch langsames Auflegen eines Deckglases auf den mit kalottenförmigen Kolonien bewachsenen Nährboden erreicht und polarisationsmikroskopisch verfolgt werden. Das aufgelegte Deckglas verformt die kalottenförmigen Kolonien zu Kegelstümpfen. Die Abb.2 zeigt die Aufnahme ein und derselben Kolonie vor und nach dem Auflegen eines Deckglases: Das vor dem Auflegen deutlich konturierte Polarisationskreuz ist in seiner spezifischen Art auch nach der Deformierung der Koloniefom deutlich erkennbar geblieben; als Ausdruck der Verformung erscheint es flächenmäßig größer, lichtschwächer und weniger scharf konturiert. Mithin scheint der Schluß zulässig, daß eine nennenswerte Beeinflussung der polarisationsoptischen Erscheinungen kalottenförmiger Kolonien durch die gekrümmte Koloniooberfläche nicht vorliegt.

d) Untersuchung auf das Vorliegen von Depolarisationsvorgängen.
An mikroskopisch feinen Spalten, Lammelierungen oder gitterartigen Strukturen sind Veränderungen des polarisierten Lichtes in Richtung auf eine Depolarisation beschrieben worden (AMBRONN (3); RINNE-BEREK (54)). Es ist anzunehmen, daß die in einem Kolonieverband zusammengeschlossenen Bakterien nicht lückenlos aneinander liegen, so daß feinste Spaltbildungen resultieren können. Außerdem entsprechen die Dimensionen der Einzelkeime normalerweise den von AMBRONN (3) angegebenen Abmessungen von Spaltbildungen, an denen er bestimmte Veränderungen des durchfallenden linear polarisierten Lichtes hat beobachten können; es erscheint zulässig, die von AMBRONN beschriebenen Phänomene auch auf die Wirkung von Einzelbakterien zu übertragen, da sie den umgekehrten Fall eines "Spaltes" vor-

stellen (siehe hierzu auch in der Diskussion über die Untersuchung von Einzelkeimen im polarisierten Licht).
Da sich jede Art von Doppelbrechung polarisationsoptisch charakterisieren läßt, im Gegensatz hierzu der Depolarisationseffekt eine Annäherung des polarisierten Lichtes an den Zustand des nichtpolarisierten Lichtes bedeutet, kann eine Depolarisation vermieden werden, indem die optische Homogenität des Objektes künstlich hergestellt wird; dies kann erreicht werden, wenn die Brechzahlen der einzelnen Komponenten der Untersuchungsobjekte einander angeglichen werden. Zweifellos stellt ein Einzelkeim an sich schon ein System aus vielen Bestandteilen dar, deren Brechungszahlen sich voneinander unterscheiden. Das Auflösungsvermögen der Lichtmikroskope liegt jedoch etwa im Bereich der Dimensionen von Einzelbakterien einerseits; auf der anderen Seite dürften die Konzentrationen der Komponenten so gering sein, daß ihr unterschiedliches optisches Verhalten im Hinblick auf Depolarisationsvorgänge nicht mehr zum Tragen kommen kann, so daß für lichtmikroskopische Untersuchungen der einzelne Keim durch nur eine Brechzahl charakterisiert anzunehmen ist. Damit stellt sich die Aufgabe, die möglicherweise vorhandenen Zwischenräume innerhalb einer Kolonie mit einem Medium auszufüllen, das dieselbe Brechzahl hat wie die Einzelkeime. Der Weg dies zu erreichen, ist nur möglich, indem die Kolonie mit Medien verschiedener Brechzahlen in toto imbibiert wird.
Eine Durchtränkung von unbehandelten Kolonien ist unmöglich, weil der Zusammenhalt der Einzelkeime in der Kolonie durch jede Art von Flüssigkeit weitgehend aufgehoben wird. Deshalb wurden die Kolonien vor der Imbibierung einer fixierenden Behandlung (siehe hierzu den nächsten Abschnitt) unterworfen. Es wurden auf

einer bewachsenen und fixierten Agar-Agar-Platte charakteristische Stellen ausgesucht, eine typische kalottenförmige Kolonie vermessen (s.u.), dieser Bezirk photographiert und seine Position durch die Tischmarkierung notiert. Danach erfolgte die Imbibierung direkt oder, falls die Fixationsflüssigkeit nicht direkt mischbar mit dem Imbibitionsmedium war, die Zwischenschaltung eines Übergangsmediums. Die Imbibitionsflüssigkeit wurde innerhalb von einer Woche drei mal gewechselt und erneuert. Im Anschluß an die Durchtränkung wurde dieselbe Kolonie, die durch die Tischmarkierung und die Fotographie nach einiger Übung rasch wieder aufzufinden war, erneut vermessen.

Obwohl die fixierten Kolonien sehr viel stabiler gegenüber allen Manipulationen sind als solche, die unbehandelt waren, war es dennoch nicht möglich, ein und dieselbe Platte durch alle Medien (Tab.1, S.21), die zur Untersuchung kamen, hindurchzuführen, so daß für jedes Imbibitionsmedium eine mit Kolonien bewachsene Agar-Platte vorbereitet wurde.

Der Meßvorgang, die Bestimmung der Gangunterschiede jeweils einer Kolonie vor und nach der Imbibierung bereitete Schwierigkeiten. Zunächst wurden nur solche Kolonien ausgesucht, deren Gangunterschiede in den Grenzen lagen, die eine Verwendung des SENARMONT-Kompensators zuließen (die Kompensationsmessung nach SENARMONT ist eine der einfachsten Arten der Gangunterschiedsmessungen, die aber nur an Objekten möglich ist, die maximal einen Gangunterschied von $1/4\lambda$ aufweisen). Die Beurteilung erfolgte über das Ablesen des einer bestimmten Polarisationsfarbe zukommenden Gangunterschiedes aus der Farbtafel nach MICHEL-LEVY. Da es nicht möglich war, mit der zur Verfügung stehenden interferenzoptischen Ausrüstung nach JAMIN-LEBEDEFF hinreichend genau die Dicke der Kolonien zu

Tabelle 1

Nr.	Medium	Zwischenmedium	n_{20}^{o}
1	Aqua dest.	-	1,33
2	A.dest./Glycerin	Aqua dest.	1,35
3	A.dest./Glycerin	Aqua dest.	1,4o
4	A.dest./Glycerin	Aqua dest.	1,45
5	Xylol/Anisöl	Xylol	1,5o
6	Xylol/Anisöl	Xylol	1,52
7	Xylol/Anisöl	Xylol	1,54
8	Schwefelkohlenst./ Xylol	Xylol	1,56
9	Schwefelkohlenst./ Xylol	Xylol	1,58
10	Schwefelkohlenst.	Xylol	1,60

Tab.1: Imbibitionsmedien mit verschiedenen Brechungsindices und den dazugehörenden Zwischenmedien.

bestimmen [+], wurde auf die Errechnung des absoluten Gangunterschiedes verzichtet und statt dessen eine relative Maßzahl für die Größe der Gangunterschiedsdifferenz gebildet, indem der Wert der Gangunterschiedsmessung B nach der Durchtränkung dividiert wurde durch den Wert A vor der Imbibierung. Die Werte für die Quotienten B/A in Abhängigkeit vom verwendeten Imbibitionsmittel sind in der Kurve der Abb.3 dargestellt worden. Die Kurve der Abb.3 fällt in ihrem Anfangsteil zunächst, um dann bei der Durchtränkung mit Medien höherer Brechzahlen flacher zu werden. Hier dürfte es zur weitgehenden Angleichung der Brechungsindices der Einzelkeime und der des sie durchtränkenden Mediums gekommen sein. Neben der Messung des Gangunterschiedes der einzelnen Imbibitionsstufen erfolgte regelmäßig die Bestimmung des optischen Charakters der beobachteten polarisationsoptischen Erscheinungen (siehe dazu nächsten Abschnitt). Eine Änderung des optischen Charakters konnte während der gesamten Untersuchungsreihe nicht festgestellt werden. Damit kann für den untersuchten Brechungsindexbereich das Vorliegen von negativer Formdoppelbrechung ausgeschlossen werden [++].

[+] Der sogenannte Meßbereich bei der Interferenzeinrichtung nach JAMIN-LEBEDEFF ist in Abhängigkeit von der Optik genau begrenzt; seine Dimensionen sind selbst bei der Verwendung des Objektives mit der Maßstabszahl 10 noch zu klein, als daß eine Kolonie vollkommen erfaßt werden könnte. Außerdem konnten selten weit herausgewanderte Kolonien gefunden werden, die eine Vermessung ohne Störung der Vergleichsstrahlengänge durch andere erlaubten.

[++] Nach WIENER (89) werden als Formdoppelbrechung diejenigen polarisationsoptischen Erscheinungen bezeichnet, deren Ursache die orientierte Anordnung optisch isotroper, anisodiametrischer Teilchen, deren Dimensionen im Vergleich zur Wellenlänge des verwendeten Lichtes klein ist mit dem Brechungsindex n_1 in einem Medium mit dem Brechungsindex n_2, bezeichnet. Der optische Charakter kann dabei sowohl positiv als auch negativ sein. Sind die die Formdoppelbrechung hervorrufenden Teilchen optisch anisotrop, kommt es zum Zusammenwirken der nun noch neben der Formdoppelbrechung vorhandenen Eigendoppelbrechung der Teilchen, welche ihrerseits wiederum sowohl optisch positiven als auch optisch negativen Charakter haben kann. Der Wert

Während keiner Messung konnte eine qualitative Änderung der polarisationsoptischen Erscheinungen beobachtet werden, die auf eine Depolarisation hindeuten könnte, d.h. eine Annäherung des von den Objekten durchgelassenen Lichtes an den Schwingungszustand des unpolarisierten Lichtes, so daß geschlossen werden kann: Eine maßgebliche Beein - trächtigung der polarisationsoptischen Bilder von kalottenförmigen Kolonien bei Betrachtung im linear polarisierten Licht zwischen gekreuzten Polarisations-Filtern durch Depolarisationsvorgänge liegt nicht vor.

++) (Fortsetzung von Seite 22)
für die aus beiden Arten von Doppelbrechung resultierenden Gesamtdoppelbrechung ist abhängig von dem Zusammenfallen des optischen Charakters von Form- und Eigendoppelbrechung = Summierung bzw. von deren Verschiedensein = Verkleinerung (in Abhängigkeit von der Einzelgröße).

B. Unterscheidung zwischen optischer Anisotropie und optischer Aktivität

a) Charakterisierung optisch aktiver isotroper und optisch aktiver anisotroper Medien:
Die vom Polarisator kommende Schwingung des Lichtes zerfällt beim Eintritt in ein optisch aktives isotropes Medium in zwei entgegengesetzt umlaufende zirkulare Schwingungen von unterschiedlicher Fortpflanzungsgeschwindigkeit, denen die Brechzahlen n_1 und n_2 zugeordnet sind. $n_1 - n_2$ wird als "zirkulare Doppelbrechung" bezeichnet. Ist die linksorientierte Welle die schnellere, spricht man von linkem optischen Drehungsvermögen und umgekehrt versteht man unter rechtem optischen Drehungsvermögen ein Vorauseilen der rechtsdrehenden Welle.
Die Orientierung der resultierenden linearen Schwingung ist unabhängig vom Azimut des Untersuchungsobjektes, d.h. von seiner Lagerung zur Schwingungsrichtung des einfallenden polarisierten Lichtes. Es zeigt deshalb ein solches Material bei direkter polarisationsoptischer Betrachtung während einer Umdrehung des Mikroskop-Tisches keinerlei Veränderung der Helligkeit. Bei Betrachtung im weißen Licht erscheint optisch aktives isotropes Material aufgrund der Dispersion +) zwischen gekreuzten Polarisations-Filtern in verschiedenen Interferenzfarben.

+) Unter Dispersion der Doppelbrechung wird die Änderung der Stärke der Doppelbrechung in Abhängigkeit von der Wellenlänge des verwendeten Lichtes verstanden. Je nach untersuchtem Objekt können sogenannte Dispersionskurven aufgestellt werden, die die Änderungen der Stärke der Doppelbrechung entsprechend der benutzten Wellenlänge bei Durchstrahlung ein und derselben Objektstelle für die Lichtanteile n_g und n_k darstellen. Bei der Verwendung von weissem Licht, dem Gemisch von Lichtanteilen verschiedenster Wellenlängen, drückt sich die unterschiedliche Änderung der Stärke der Doppelbrechung in mehreren Farbtönen aus.

Ähnlich reagieren optisch aktive anisotrope Medien: Mit zunehmender Neigung gegen die Sonderrichtungen, in denen zirkulare Doppelbrechung auftreten kann, werden die zu beobachtenden Interferenzerscheinungen gleich denen von optisch inaktiven anisotropen Medien.

b) Charakterisierung optisch inaktiver anisotroper Medien: Solche Medien zeigen bei einer vollständigen Umdrehung des Mikroskop-Tisches von 360° bei Betrachtung zwischen gekreuzten Polarisations-Filtern vier Stellungen, in denen das Objekt dunkel erscheint und vier dazu diagonal liegende Stellungen, in denen es aufhellt.
Der Grad der Aufhellung hängt vom Gangunterschied, den das polarisierte Licht im Objekt erfährt, ab.

c) Demonstration und Beschreibung der polarisations-optischen Bilder kalottenförmiger Kolonien:
Die Abb. 4 a und b zeigen die Bilder kalottenförmiger Kolonien, wie sie bei Betrachtung der Kolonien im linear polarisiertem Lichte zwischen gekreuzten Polarisations-Filtern zu beobachten sind. Beide Abbildungen unterscheiden sich dadurch, daß die Abb.4a das Bild einer rasch auf der Stelle rotierenden Kolonie zeigt, während die Abb.4b dieselbe Kolonie nach ihrer Fixierung wiedergibt. Hinsichtlich der qualitativen Erscheinungen kann an beiden Bildern kein Unterschied gefunden werden; beide zeigen vier Sektoren, in denen Dunkelheit herrscht und die zusammen das typische Polarisationskreuz bilden, deren Achsen parallel zur Schwingungsrichtung von Polarisator und Analysator liegen und vier diagonal hierzu liegende Aufhellungsbezirke. Bei der Drehung der fixierten Kolonie um 360° verbleiben die dunklen Kreuzbalken, ebenso wie die Aufhellungsbezirke in ihren Positionen. Die in den Bildern von rotierenden kalottenförmigen Kolonien zu beobachtenden

dunklen ringförmigen Streifen sind als durch die Aufnahmetechnik bedingte Artefakte anzusehen (näheres hierüber in der Diskussion).
Intensität und Farberscheinungen in den Aufhellungsbezirken hängen vom Gangunterschied, den das polarisierte Licht innerhalb der Objekte erfährt, ab; die Größe des Gangunterschiedes ist dabei direkt proportional der Konzentration der anisotropen Komponente.
In den Aufhellungsbezirken der kalottenförmigen Kolonien können Polarisationsfarben von Grau-Weiß I. Ordnung bis Gelb-Weiß I.Ordnung festgestellt werden. Dies entspricht einem Gangunterschiedsbereich von etwa 4o bis 27o nm (abgelesen in der Farbtafel nach MICHEL-LEVY). Es wurden dabei die Polarisationsfarben, denen kleine Gangunterschiede zuzuordnen sind, bei kleinen Kolonien beobachtet, während gelblich-weiße Farbtöne nur bei sehr großen Kolonien festgestellt werden konnten. Da die Entstehung der kalottenförmigen Kolonie durch eine Zunahme der Zahl der aufeinanderliegenden Bakterienschichten beschrieben wurde (GILLERT (33)), ist anzunehmen, daß die Konzentrationserhöhung des anisotropen Materials gleichbedeutend ist mit der Dickenzunahme der Kolonien.
Aus diesen Untersuchungen kann der Schluß gezogen werden, daß es sich bei den an kalottenförmigen Kolonien von Bac.circulans im linear polarisierten Licht zwischen gekreuzten Polarisations-Filtern beobachtbaren optischen Erscheinungen um die Wirkung eines optisch inaktiven anisotropen Materials handelt.

Der nächste Schritt ist nun,festzustellen, welchen optischen Charakter [+)] das anisotrope Material hat. Da die auf Nähr-

[+)] Optischer Charakter:Synonyma für den Ausdruck relatives Vorzeichen der Doppelbrechung einer gegebenen Indexellipse bei Vernachlässigung der wirklich vorhandenen Indikatrix. Es wird vielmehr die Lage der Indexellipse hinsichtlich einer morphologisch ausgezeichneten Richtung des Objektes gekennzeichnet. Bei kugeligen Objekten ist dies der Radius, bei Fasern die Längsachse.

Agar gewachsenen kalottenförmigen Kolonien bei der Feststellung des optischen Charakters keine eindeutig charakterisierbaren Farberscheinungen aufwiesen, war die Beantwortung dieser Frage auf direktem Weg nicht möglich. Von der Überlegung ausgehend, daß optische Anisotropie einerseits direkt proportional der Schichtdicke des anisotropen Materials ist,und daß auf der anderen Seite eine Steigerung des Doppelbrechungsvermögens durch eine Änderung des Verhältnisses der Brechungsindices n_α und n_γ herbeigeführt werden kann, wurde versucht, durch geeignete Maßnahmen eine Zunahme der Doppelbrechung zu erreichen. Es wurden zwei verschiedene Versuchsreihen durchgeführt:

1. Systematische Veränderungen des Nährstoffangebotes sollten eine möglichst optimale Nährstoff-Kombination ergeben, bei welcher es entweder über eine Zunahme der polarisationsoptisch wirksamen anisotropen Komponente innerhalb der Kolonie oder(und) über die Ausbildung von kalottenförmigen Kolonien größerer Schichtdicke zu einer Zunahme der Doppelbrechung kommt.

2. Versuche, durch Veränderung der physikalischen Eigenschaften des anisotropen Materials in Richtung auf eine Vergrößerung der Differenz zwischen den Brechzahlen n_α und n_γ eine Zunahme der Doppelbrechung zu erhalten. Hierfür wurden eine Anzahl von Fixationsmitteln und ihre Wirkung auf die Kolonien geprüft.

C. Das Koloniewachstum auf modifizierten Nährböden und Ausschluß polarisationsoptisch wirksamer Nährbodenbestandteile als Ursache der polarisationsoptischen Erscheinungen

a) Das Koloniewachstum auf modifizierten Nährböden:
Bei der Herstellung der verschiedenen Nährböden wurde zunächst von Agar-Nährböden ausgegangen, denen verschiedene Monosaccharide in unterschiedlichen Kombinationen und mit verschiedenem Prozentgehalt zugesetzt worden waren. Folgende Monosaccharide wurden hinzugefügt: Glucose, Mannose, Fructose; Konzentrationen von o,5 bis lo %.
Größere Unterschiede hinsichtlich des makroskopischen Aussehens der Kolonien auf diesen modifizierten zukkerhaltigen Nährböden waren nicht zu beobachten. Das Aussehen der Kolonien im Gegensatz zu solchen, die auf Agar-Nährböden ohne diese Zusätze gewachsen waren, läßt sich deshalb gleichzeitig für alle diese Nährbodenmodifikationen beschreiben: Es unterblieb die Ausbildung der für das Wachstum auf Agar-Nährböden typischen Kolonienformen- kalottenförmige Kolonie, ringförmige Kolonie und gestreckte Wanderform (GILLERT (32,33)) zugunsten eines flächigen sehr unregelmäßigen dem Bilde einer Landkarte vergleichbaren Koloniewachstums. Das Wachstum der Keime auf den zuckerhaltigen Nährböden war sehr gut, um nicht zu sagen üppig. Beim makroskopischen Vergleich der Farbe und Transparenz mit den Kolonien, die auf Kontroll-Agar-Nährböden gewachsen waren, konnte eine Abnahme der Lichtdurchlässigkeit und das Fehlen der Opaleszenz und dafür das Auftreten einer weißlichen Farbe beobachtet werden. Vergleichende Dickenmessungen wurden, da eine interferenzoptische Dickenbestimmung nicht durchführbar war (siehe auch Diskussion)

mit Hilfe der "Fokussierungs-Methode"[+)] durchgeführt. Eine Dickenzunahme der auf den modifizierten Nährböden gewachsenen Kolonien konnte hiermit nicht festgestellt werden. Es wurden aber bei diesen Kolonien positive Resultate bei der polarisationsoptischen Untersuchung mit dem Hilfsobjekt Gips Rot I. Ordnung festgestellt: Das Auftreten von deutlich voneinander unterscheidbaren Polarisationsfarben. Leider konnten diese Erscheinungen nicht für die gegebene Fragestellung genutzt werden, weil es nicht zur Ausbildung der typischen kalottenförmigen Kolonien mit der hierfür charakteristischen Polarisationskreuzbildung kam. Die Zunahme der Doppelbrechung, welche dem Erscheinen deutlicher Polarisationsfarben bei auf zuckerhaltigen Nährböden gewachsenen Kolonien zu Grunde lag, müßte daher, da eine eindeutige Dickenzunahme der Kolonien nicht festgestellt werden konnte, auf eine vermehrte Bildung des optisch wirksamen Materials zurückgeführt werden.

Eine andere Serie modifizierter Nährböden wurde hergestellt, indem die sonst im gewöhnlichen Agar-Nährboden vorhandenen Stickstoffquellen (Pepton und Lab. Lemco-Powder) fortgelassen wurden und an ihre Stelle einzelne Aminosäuren zugegeben wurden. Es wurden die Aminosäuren Histidin, Arginin, Leucin und Valin in Konzentrationen von o,5 bis lo % hinzugefügt. Wiederum können die Ergebnisse dieser Versuche für alle Nährbodenmodifikationen insgesamt beschrieben werden, weil keine größeren qualitativen oder quantitativen Unterschiede innerhalb der Reihe der Modifika-

---

[+)] Dickenbestimmung durch die Fokussierungsmethode erfolgt, indem auf die Ober- und Unterseite eines Objektes fokussiert wird und die Differenz beider Einstellungen am Feintriebknopf des Mikroskopes abgelesen wird. Diese Methode erlaubt nur orientierende Untersuchungen.

tionen feststellbar waren: Ebenso wie beim Wachstum auf den zuckerhaltigen Nährmedien fehlte auf den Nährböden dieser Serie die typische Ausbildung der einzelnen Kolonieformen, hier aber noch ausgeprägter als bei dem Koloniewachstum auf den zuckerhaltigen Nährböden. Die Ausbildung der Kolonien erfolgte sehr langsam, eventuell vor allem dadurch bedingt, daß diese Kolonien die Fähigkeit verloren hatten, über die Nährbodenoberfläche zu wandern. An den Keimen aus solchen Kolonien konnte bei der Beobachtung im hängenden Tropfen trotzdem Eigenbeweglichkeit registriert werden. Die Kolonien erschienen makroskopisch kompakt, hatten die sonst vorhandene Semitransparenz fast vollständig verloren und waren von gelblich-weißer, manchmal auch bräunlicher Farbe. Bei der polarisationsoptischen Untersuchung mit dem Hilfsobjekt Gips Rot I. Ordnung zeigten vor allem die Teile der Kolonien, die im Impfpunktsbereich oder in dessen unmittelbarer Umgebung lagen, lebhafte Polarisationsfarben. Vergleichende Dickenmessungen ergaben, daß diese Kolonieteile größere Schichtdicken aufwiesen, als sie sonst feststellbar waren.
Die Beurteilung dieser Ergebnisse ist hier insofern nicht eindeutig, weil sowohl die Dickenzunahme als auch eine mögliche Zunahme des polarisationsoptisch wirksamen Stoffes ursächlich für die Zunahme der Doppelbrechung sein können. Wegen des Ausbleibens der Bildung von kalottenförmigen Kolonien konnten aber auch diese Ergebnisse nicht weiter verwertet werden.

Deshalb wurde eine dritte Reihe von modifizierten Nährböden hergestellt, bei welcher nacheinander die Bestandteile des normalen Agar-Nährbodens fortgelassen wurden (Tab.2).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Agarose 2,o g	Agarose 2,o g	Agarose 2,o g	Agarose 2,o g	Agarose 2,o g	Agarose 2,o g	Agarose 2,o g	Agarose 2,o g	Agarose 2,o g	Agarose 2,o g
A.dest. loo ml	A.dest. loo ml	A.dest. loo ml	A.dest. loo ml	A.dest. loo ml	A.dest. loo ml	A.dest. loo ml	A.dest. loo ml	A.dest. loo ml	A.dest. loo ml
-	NaCl 1,5 g	NaCl 1,5 g	NaCl 1,5 g	NaCl 1,5 g	NaCl 1,5 g	NaCl 1,5 g	NaCl 1,5 g	-	-
-	-	Na_2HPO_4 1,5 g	Na_2HPO_4 1,5 g	Na_2HPO_4 1,5 g	Na_2HPO_4 1,5 g	Na_2HPO_4 1,5 g	-	Na_2HPO_4 1,5 g	-
-	-	-	Lab.Lem. Powder 7,o g	Lab.Lem. Powder 7,o g	-	Lab.Lem. Powder 7,o g	Lab.Lem. Powder 7,o g	Lab.Lem. Powder 7,o g	Lab.Lem. Powder 7,o g
-	-	-	-	Pepton lo,o g	Pepton lo,o g	-	Pepton lo,o g	Pepton lo,o g	Pepton lo,o g

Tabelle 2 Nährboden - Modifikationen hergestellt aus Bestandteilen des Agar-Agar-Hährbodens.

Beim Fehlen der Stickstoffquellen Pepton oder Lab. Lemco-Powder bzw. beider Stickstofflieferanten unterblieb die Bildung von gestreckten Wanderformen und ringförmigen Kolonien, die Semitransparenz der Kolonien hatte etwas abgenommen, und die Fähigkeit der Wanderung der Kolonien über die Nährbodenoberfläche war nicht mehr vorhanden. Die Dickenmessungen ergaben keinen Unterschied zu den auf den nicht veränderten Nährböden gewachsenen Kolonien. Polarisations - optische Erscheinungen konnten teilweise im Impf - punktsbereich der Kolonie beobachtet werden, jedoch waren diese so schwach, daß eine Demonstration nicht möglich ist.

Nur eine Nährbodenmodifikation, die Nr.8 der Tab.2, brachte zufriedenstellende Ergebnisse: Auf diesem Nährboden waren die einzelnen Kolonieformen gebildet worden, makroskopisch ließ sich zu den Kolonien der nicht modifizierten Nährböden kein Unterschied feststellen, die Kolonien wanderten über die Nährboden - oberfläche, und es kam zur Ausbildung besonders grosser kalottenförmiger Kolonien, an welchen auch eine Zunahme der Schichtdicke feststellbar war. Polarisationsoptisch zeigte der größte Teil der gebildeten kalottenförmigen Kolonien ein Polarisationskreuz und bei der Untersuchung mit dem Hilfsobjekt Gips Rot 1. Ordnung konnten deutliche Unterschiede der einzelnen Farbtöne festgestellt werden: Die zuvor dunklen Kreuzbalken zeigten die Polarisationsfarbe Rot I.Ordnung, während im 1.und 3.Quadranten ein Ansteigen der Polarisationsfarben (Additionsfarben) und im 2.und 4.Quadranten Substraktionsfarben (Polarisationsfarben niedrigerer Ordnung) beobachtet wurden. Die Intensität der Farberscheinungen allerdings war nicht sehr stark ausgeprägt, reichte aber etwa an die der Kolonien, die auf den zuckerhaltigen Nährmedien gewachsen waren, heran.

Somit konnte der optische Charakter von kalottenförmigen Kolonien als "optisch positiv" eindeutig gekennzeichnet werden.

b) Ausschluß der polarisationsoptischen Wirkung von angereicherten Nährbodenbestandteilen:
Diese Untersuchung wurde mit den zuletzt beschriebenen Nährbodenmodifikationen durchgeführt, nur wurde als Gel-Substanz nicht Fadenagar, sondern gereinigte Agarose verwendet, um auch die im Fadenagar enthaltenen Verunreinigungen wie z.B. Mucopolysaccharide, welche polarisationsoptisch wirksam werden könnten, auszuschalten. Beobachtet wurden die polarisationsoptischen Erscheinungen der gewachsenen Kolonien zwischen gekreuzten Polarisations-Filtern und mit dem Hilfsobjekt Gips Rot I.Ordnung. Alle Kolonien zeigten dieselben qualitativen polarisationsoptischen Erscheinungen; Unterschiede ergaben sich nur in Abhängigkeit von den vorhandenen Koloniefermen. Die Sicherung des Ergebnisses ist vor allem dadurch gegeben, daß selbst auf dem nur aus Agarose und Aqua dest. bestehenden Nährboden noch Koloniewachstum beobachtbar war und daß diese Kolonien ebenfalls polarisationsoptisch wirksam waren.
Die Resultate dieser Untersuchungsreihe zeigen, daß eine Anreicherung von Nährbodenbestandteilen, welche als Ursache der polarisationsoptischen Erscheinungen wirksam werden könnten, nicht vorliegt.

D. Das Verhalten von fixierten Bakterienkolonien bei polarisationsoptischer Untersuchung

Bei einer Reihe von Untersuchungen biologischen Materials mit dem Polarisationsmikroskop war es nötig, über den Umweg gezielter Zustandsänderung der zu untersuchenden Objekte weitergehende Aussagen zu erhalten, als es an unbehandelten Objekten möglich war.

Dafür kommen physikalische und chemische Behandlungen infrage. Als Beispiele seien genannt die Arbeiten von SCHMIDT (7o) vor allem über die Texturen von gelartigen Substanzen und die Entwicklung der topochemischen "Phenolreaktion des Kollagens" durch v.EBENER (22).
Die in der Histologie angewendeten Fixierungsverfahren sind hinsichtlich ihrer Wirkungsweisen auch heute noch nicht ausreichend untersucht und bekannt. Wahrscheinlich spielen hier sowohl Veränderungen der physikalischen Eigenschaften, z.B. der Wasserentzug bei Behandlung mit alkoholischen Fixierungsmitteln, als auch dadurch bedingte chemische Veränderungen der behandelten Objekte gleichermaßen eine Rolle.

Für die nun zu schildernden Versuche wurden zur Behandlung der Kolonien folgende Fixierungsmittel und Techniken verwendet: Carnoy'sche Flüssigkeit, 1o %iges neutrales Formalin, gesättigte Phosphorwolframsäure in 7o % Äthanol und die Gefriersubstitution bei -7o°C in absolutem Äthanol.
Bei der Fixierung wurde auf zweierlei Art vorgegangen: Einmal kamen in toto, d.h. Agar + Kolonie, fixierte Kolonien zur Untersuchung und zum zweiten wurden Abklatschpräparate der Kolonien auf Deckgläschen fixiert.

a) Polarisationsoptische Erscheinungen der in toto fixierten Bakterienkolonien:
Alle Erscheinungen der mit den verschiedenen Fixierflüssigkeiten behandelten Kolonien von Bac.circulans waren qualitativ untereinander gleich. Sie entsprechen im wesentlichen den unter Abschnitt C. beschrie-

benen Erscheinungen: Zwischen gekreuzten Polarisations-Filtern zeigen kalottenförmige Kolonien bei Betrachtung im linear polarisierten Licht ein dunkles Polarisationskreuz und diagonal dazu liegende Aufhellungsbezirke.
Bei der Beobachtung mit dem Hilfsobjekt Gips Rot I. Ordnung zeigen sich die zuvor dunklen Kreuzbalken in der Polarisationsfarbe Rot I.Ordnung, während der 1. und 3.Quadrant Additionsfarbe und der 2.und 4.Quadrant Subtraktionsfarbe aufweisen.(Abb.5). Der optische Charakter der mit den angegebenen Mitteln fixierten Kolonien ist demnach unverändert geblieben.

b) Vorgänge bei der Fixierung von Deckglas-Abklatschpräparaten:
Die Beobachtung der Fixierungsvorgänge an Kolonie-Klatschpräparaten sollte in erster Linie dazu dienen, die bei der Fixierung eventuell ablaufenden Veränderungen polarisationsoptisch verfolgen zu können. Zu diesem Ziel ist es zweckmäßig, daß von einer Hilfsperson am Rande des mit der Abklatschseite auf einem Objektträger liegenden Deckglases vorsichtig ein Tropfen der Fixierungsflüssigkeit mit einer Kapillare aufgetragen wird, so daß eine fortlaufende Beobachtung der nun ablaufenden Vorgänge im Polarisationsmikroskop erfolgen kann.
Für den weiteren Verlauf der Arbeit waren dabei die Veränderungen, welche sich bei der Behandlung der Klatschpräparate mit alkoholischen Fixierungsmitteln (siehe hierzu unter Abschnitt C.) abspielten, von Bedeutung:
Die luftgetrockneten Bakterienkolonien zeigten vor der Zugabe des Fixierungsmittels bei Betrachtung im linear polarisierten Licht zwischen gekreuzten Polarisations-Filtern ein deutliches Polarisationskreuz, welches allerdings häufig schräge Achsenarme aufwies, bedingt durch die Technik des Abklatschens der Kolonien von der Agaroberfläche. Die Intensität

der diagonalen Aufhellungsbezirke war größer als bei der Untersuchung von nichtabgeklatschten noch auf der Agaroberfläche liegenden Kolonien. Polarisationsfarben, so wie oben und unter C.beschrieben, waren bei Zuhilfenahme des Hilfsobjektes Gips Rot I.Ordnung nicht zu beobachten; die gesamte Kolonie zeigte sich in der Farbe des Untergrundes, d.h. Rot I.Ordnung.
Nach der vorsichtigen Zugabe der Fixierungsflüssigkeit treten dann bei den größten Kolonien nach einer Einwirkungszeit von ca. 5 Minuten die typischen Polarisationsfarben auf. Ihre Intensität ist zwar wegen der geringen Schichtdicke schwach, doch können die Farbunterschiede genau festgestellt werden. Sie entsprechen den unter C. und am Anfang dieses Abschnittes beschriebenen polarisationsoptischen Erscheinungen.

Aufgrund der geringen Flüssigkeitsmengen, die zur Deckglasfixierung ausreichten, kam es schon nach etwa lo Minuten zum Verdunsten vor allem der leichtflüchtigen Anteile (Chloroform und abs.Äthanol). Dabei war sehr auffällig, daß solche Kolonien, die schon frei von Flüssigkeiten waren, ihre spezifischen polarisationsoptischen Eigenschaften verloren hatten: Diese Kolonien hellten im linear polarisierten Licht zwischen gekreuzten Polarisations-Filtern gleichmäßig auf, das für die kalottenförmigen Kolonien typische Polarisationskreuz war verschwunden; bei der Betrachtung der Koloniebilder mit dem Hilfsobjekt Gips Rot I.Ordnung zeigten sie wieder Rot I. Ordnung, wie auch der sie umgebende freie Raum. Der Austrocknungsvorgang wurde meistens in den zentralen Bezirken der Abklatschpräparate erkennbar, so daß die weitergehende Betrachtung dieses Vorganges schließlich am Deckglasrand ihr Ende fand. An

verschiedenen Stellen der Deckglasränder konnte die Beobachtung gemacht werden, daß es dort zur Ablagerung eines im Durchlicht und Phasenkontrast strukturlosen Materials gekommen war. Bei polarisationsoptischer Betrachtung, zunächst ohne Hilfsobjekt, waren jedoch in diesen Bezirken unregelmäßige dunkle und helle Zonen anzutreffen, und diese letzteren Gebiete waren durch eine hohe Helligkeitsintensität ausgezeichnet. Nach Einschieben des Hilfsobjektes Gips Rot I.Ordnung leuchteten diese Materialien in lebhaften Polarisationsfarben auf, wobei dieselben Farberscheinungen, jedoch von kräftigerer Intensität, vorgefunden wurden, wie sie kalottenförmige Kolonien zeigen können: Zuvor dunkle Bezirke zeigten Rot I.Ordnung und in den aufgehellten Teilen konnten Additionsfarben (blaue und blaugrünliche Farbtöne) und Substraktionsfarben (orange und gelbe Farben) beobachtet werden.
Nach diesem Befund konnte man vermuten, daß die spezifischen polarisationsoptischen Erscheinungen der Kolonien von Bac.circulans an einen bestimmbaren Stoff oder an ein Stoffgemisch gebunden sind. Dieser Stoff schien in einer relativ losen Beziehung zum Bakterium zu stehen.

In einem von FORSYTH und WEBLEY (25) beschriebenen Extraktionsgang zur Gewinnung von Bakterienkapselmaterial, u.a. auch von Keimen der Bac.circulans-Gruppe, bestand der erste Schritt in einer Fällung dieser Substanzen in alkoholischen Lösungen. Dieser Hinweis ließ vermuten, daß eine Verbindung zu den oben beschriebenen Ergebnissen der Deckglasfixation möglich sein könnte, obwohl wir in mehreren Versuchen keine Kapseln bei dem von uns untersuchten Stamm ATCC 9966 nachweisen konnten.
In Vorversuchen sollte mit einer kleinen Menge an Ausgangsmaterial - 2o bebrütete Kulturschalen - geprüft werden, ob

das Extraktionsverfahren von FORSYTH und WEBLEY sich auch für die Gewinnung des Stoffes, an welchen wir die polarisationsoptischen Erscheinungen der Bakterienkolonien gebunden meinten, zu verwenden sei. Im Hinblick auf die verfügbaren technischen Hilfsmittel wurden in einigen Punkten Abänderungen im Vergleich zu den Originalangaben vorgenommen (genaue Beschreibung der benutzten Methodik unter "Material und Methoden"), die Grundzüge des Originalverfahrens wurden beibehalten.
Nachdem es in diesen Vorversuchen reproduzierbar zur Gewinnung eines polarisationsoptischen wirksamen Stoffes gekommen war, wurde angestrebt, in einem großen Versuchsansatz eine größere Menge dieses Endproduktes zu erhalten, um auch die chemische Natur dieses Stoffes untersuchen zu können. Das Ausgangsmaterial hierfür lieferten 2oo mit Bac.circulans Stamm ATCC 9966 bewachsene Nähr-Agar-Petrischalen.

E. Das Rohprodukt der Extraktion

a) Makroskopische Beschreibung:

Das Extraktionsverfahren beruht auf der Annahme, daß der gesuchte Stoff in alkoholischen Lösungen präzipitierbar und daß dieses Präzipitat wiederum wasserlöslich ist. Nach der Reinigung dieses Präzipitates von Bakterienbeimengungen folgt deshalb als letzter Schritt die erneute Lösung in Aqua dest. Das auf einem bakteriendichten Filter liegende Präzipitat wird in einer möglichst kleinen Menge Aqua dest. aufgenommen (gelöst) und durch Saugfiltration in ein bereitstehendes Gefäß aufgefangen. In der Diskussion wird auf diesen letzten Punkt der Extraktion nochmals eingegangen.

Während alle wässerigen Phasen des Extraktionsproduktes in den vorangegangenen Schritten klar und ungefärbt erschienen, zeigte die zum Schluß erhaltene wässerige, klare Lösung einen gelblichen Farbton. Das ist wahrscheinlich durch eine höhere Konzentration der Lösung bedingt und in den oben erwähnten Extraktionsabschnitten aufgrund der Verdünnung nicht wahrnehmbar gewesen.

Die Konzentrationsbestimmung der zuletzt erhaltenen wässerigen Lösung wurde durch Wägung des Verdampfungsrückstandes im Uhrglasschälchen durchgeführt. Nach der Umrechnung ergab sich die Konzentration der wässerigen Endlösung zu o,o537 %.

Die nach dem Verdunsten des Aqua dest. zurückbleibenden Substanzkristalle hatten ebenso wie die wässerige Lösung einen leicht gelblichen Farbton und zeigten Opaleszenz. Aus Gründen der Einfachheit wird sie im fortlaufenden Text als "Substanz C" bezeichnet.

b) Untersuchung der Kristalle der "Substanz C" im polarisierten Licht:
Die Präparate für die polarisationsoptische Untersuchung wurden hergestellt, indem auf einen fettfreien Objektträger aus weißem Glas ein Tropfen der wässerigen Lösung der "Substanz C" aufgetragen wurde und im Anschluß daran das Wasser im Exsikkator verdampft wurde.
Im nichtpolarisierten Licht konnten die ausgefallenen Kristalle nur an ihrer unterschiedlichen Brechung gegenüber dem Medium (Diatex-Caedax-Gemisch von n = 1,53) am Wandern der BECKE'schen Linie beim Fokussieren erkannt werden. Eine Eigenfärbung der Kristallite konnte nicht beobachtet werden.
Bei der direkten Betrachtung im linear polarisierten Licht zwischen gekreuzten Polarisations-Filtern zeigten die Kristalle lichtstarke Aufhellungszonen, deren Anordnung keine Regel erkennen ließ. Sie zeigten die Polarisationsfarbe weiß-grau bis weiß-gelb I.Ordnung in Abhängigkeit von der Kristallgröße und entsprachen damit den Polarisationsfarben, die bei der Betrachtung der nativen Bakterienkolonien auf der Agaroberfläche gesehen wurden. Die Beobachtung unter verschiedenen Azimuten der Kristalle ergab für den größten Teil der kristallinen Gebilde keine eindeutige Auslöschlage. Dieses Verhalten deutete auf das Vorliegen vorwiegend optisch zweiachsiger Kristallformen hin. Einzige Ausnahme hiervon zeigte sich im Verhalten der Kristallnadeln (Abb.6) (siehe unten), in denen scharf begrenzte bandartige Zonen unter einem Azimut von 0^{o}, 90^{o}, 180^{o}, 270^{o} und 360^{o} vollkommene Auslöschung, und in den Diagonallagen hierzu maximale Aufhellung zu beobachten waren; es könnte sich dabei um optisch einachsige Kristalle handeln.
Um eindeutige Aussagen über die Anzahl der optischen Achsen machen zu können, wurden die Kristalle mit Hilfe

der indirekten Beobachtung einzeln abgesucht. Da es nicht möglich war, die Lage der Kristalle auf dem Objektträger willkürlich zu ändern, mußte solange gesucht werden, bis ein zufällig günstig orientiertes Kristall gefunden wurde. Unter den kubischen Kristallformen (siehe unten) wurden mehrere Kristalle gefunden, die so orientiert waren, daß die Wanderung der Spuren der optischen Achsen beim Drehen des Objekttisches beobachtet werden konnten. Diese Untersuchung bestätigte die Vermutung, daß der größte Teil der vorliegenden Kristallbildungen optisch zweiachsig ist. Die indirekte Beobachtung konnte wegen der geringen Dimensionen der Kristallnadeln bei dieser Kristallform nicht durchgeführt werden.
Eine Vermessung der Achsenwinkel gelang wegen der schon erwähnten Schwierigkeiten nicht; in einigen günstigen Fällen jedoch konnten Befunde erhoben werden, die die Vermutung zuließen, daß beide optische Achsen einen stumpfen Winkel bilden. Eine kristalloptische Aufarbeitung sollte im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgen, so daß keine weiteren Aussagen über die Kristallstruktur vorgelegt werden können. Die Untersuchung der Kristalle mit dem Hilfsobjekt Gips Rot I.Ordnung zeigte die Aufhellungsbezirke in lebhaften Polarisationsfarben: Blaue und blau-grünliche Additionsfarben und als Subtraktionsfarbe wieder orange oder gelbe Farbtöne. Zuvor dunkle Bereiche erschienen in Rot I.Ordnung. Trotz ausdauernden Suchens wurde kein Kristall gefunden, der so orientiert war, daß aufgrund des Achsenbildes bei dieser Untersuchung Aussagen über den vorliegenden optischen Charakter hätten getroffen werden können.
Bei dieser Untersuchung konnten die einzelnen Kristallformen beurteilt werden (Abb.6). Es lagen

1. Kubische Kristalle
2. Astroide Kristalle
3. Nadelförmige Kristalle

vor. Die kubischen Kristallformen waren mengenmäßig

am häufigsten anzutreffen (etwa 9/1o aller Kristalle) und waren am äußeren Rand der verdampften Tropfen zu finden. Im Anschluß an diese ringförmige Zone mit kubischen Kristallen folgte ein Bereich, in dem sich vorwiegend astroide Kristallformen gebildet hatten. Das Zentrum des Verdampfungsbezirkes war vor allem den nadelförmigen Kristallen vorbehalten; in geringem Umfang waren aber auch kleine kubische Kristalle zu sehen.

F. Ergebnisse der durchgeführten Analysegänge

a) Untersuchungen an der extrahierten "Substanz C":
Der Elementennachweis von Stickstoff und Phosphor aus der wässerigen Lösung der "Substanz C" ergab einen positiven Stickstoffnachweis, Phosphor konnte dagegen nicht gefunden werden.
Spot-Teste zum Nachweis von freien Aminosäuren, Monosacchariden und Mucopolysacchariden ergaben negative Resultate.

b) Untersuchungen der hydrolysierten "Substanz C":
Nach der Hydrolyse wurden die Spot-Teste zum Nachweis von freien Aminosäuren und Monosacchariden stark positiv (Abb.7).
Im nächsten Schritt wurde versucht, eine Auftrennung der Aminosäuren mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie zu erreichen. Dieses Ergebnis stimmte überein mit den photometrischen Messungen, die eine starke Absorption der gelösten "Substanz C" in Wellenlängenbereichen zwischen 3oo nm bis 25o nm ergaben. Die Abb. 8 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchungen: Auftrennung des Hydrolysates in 7 Fraktionen. Die UV-Bestrahlung ergab bei entsprechend präparierten Dünnschichtplatten beson-

ders im Gebiet der Fraktion 4 und einer färberisch nicht nachweisbaren Fraktion 7 - gelegen nach der Fraktion 6 - UV-Absorption.
Die RF-Werte der einzelnen Fraktionen wurden nicht bestimmt, so daß eine Identifizierung der Aminosäuren hier nicht gegeben werden kann.
Trotz eingehender Versuche wurde nicht erreicht, die im Spot-Test nachgewiesenen Monosaccharide in einzelne Fraktionen aufzutrennen. Während es durch aufsteigende und absteigende Papierchromatographie noch gelang, eine Wanderung der gesamten am Startpunkt aufgetragenen Substanzmenge zu erreichen, war auch dieses dünnschichtchromatographisch nicht mehr möglich: Die aufgetragene Substanzmenge blieb konstant am Startpunkt liegen und konnte hier nach Beendigung der Laufzeit reproduzierbar mit den verschiedenen Nachweisreagenzien für Monosaccharide färberisch dargestellt werden.

G. Polarisationsoptische Untersuchungen an Einzelkeimen, insbesondere der Langformen von Bac.circulans

Nach der polarisationsoptischen Untersuchung von Kolonien lag es nahe, zu versuchen, solche Untersuchungen auf den einzelnen Keim auszudehnen.
Diese wurden zunächst an luftgetrockneten Einzelkeimen durchgeführt: Bei der Orientierung der Längsachse der Bakterien zu einer der Schwingungsrichtungen von Polarisator bzw.Analysator löschten die Einzelkeime aus; in den hierzu diagonalen Lagen wurde maximale Aufhellung beobachtet. Deutbare Polarisationsfarben waren bei der Beobachtung mit dem Hilfsobjekt Gips Rot I.Ordnung nicht festzustellen. Damit entsprachen die beobachteten Phänomene genau den von AMBRONN (3) beschriebenen Erscheinungen an feinen Spaltbildungen in dünnen Metallschichten. AMBRONN deutete diese Beobachtungen als durch Beugung des polarisierten Lichtes in Abhängigkeit von den Dimen-

sionen der Spaltbildungen hervorgerufene unspezifische Erscheinung. Ein Vergleich der von AMBRONN angegebenen Abmessungen ergab Übereinstimmung mit der Dicke der von uns untersuchten Circulansbakterien. Da die Beobachtung bei der Deckglasfixation einen polarisationsoptisch wirksamen Stoff als mögliche Ursache der optischen Erscheinungen vermuten ließ, welcher zudem noch in einer relativ losen Verbindung zum Einzelkeim zu stehen schien, war der Ausgang von Versuchen, die Einzelkeime in ein Medium gleicher Brechzahl wie das der Einzelkeime einzubetten, von Anbeginn zweifelhaft. Die nach den Angaben von BAHER und JOSEPH (1o) durchgeführten Versuche, die Keime an isotonischen Albuminlösungen verschiedener Konzentration (und damit Brechungsindices) aufzunehmen, um die Brechzahl der lebenden Keime hierüber zu bestimmen, hatten ein negatives Ergebnis: Mit steigender Brechzahl der umgebenden Medien verschwanden die zuvor festgestellten und oben beschriebenen optischen Erscheinungen. Es war nicht zu entscheiden, ob dies dadurch hervorgerufen worden war, daß es zu einer Annäherung der Brechzahlen von umgebendem Medium und Bakterium gekommen war, oder daß die polarisationsoptisch wirksame Komponente allmählich herausgelöst wurde.

Um unspezifische Beugungserscheinungen weitgehend zu vermeiden, wurden die vor der eigentlichen Koloniebildung häufig auftretenden Langformen von Bac.circulans (GILLERT (35)), deren Durchmesser auch größer als derjenigen von "normalen" Circulansbakterien ist, polarisationsoptisch untersucht. Hierfür wurde entsprechendes Material in physiologischer Kochsalzlösung vorsichtig suspendiert und im linear polarisierten Licht zwischen gekreuzten Polarisations-Filtern betrachtet. Die Abb.1Oa bis c zeigen das Verhalten solcher Langformen unter den beschriebenen Bedingungen: Zu Aufhellungserscheinungen kommt es vornehmlich dann, wenn die Längsachse der Keime parallel oder annähernd parallel zu einer der Schwingungsrichtungen von Polarisator oder Analysator orientiert ist. Dementsprechend gering sind solche Phänomene in den hierzu diagonalen Lagen; dies ist am besten zu sehen

im linken Bildteil der Abb.10b.

Am bemerkenswertesten jedoch ist das Bild der aufgehellten Bakterien: Es lassen sich deutliche Zonen unterschiedlicher Intensitätsgrade feststellen. Diese Zonen zeigen zum Teil helicoide Anordnung (Abb.10a und b). Bisher war es nicht möglich, diese Befunde in Einklang mit den anderen polarisationsoptischen Ergebnissen zu bringen, deshalb kann hier nur eine Beschreibung dieser Erscheinungen erfolgen.

IV. DISKUSSION

Die Polarisationsmikroskopie bietet in der Biologie den Vorteil, lebende oder überlebende Objekte untersuchen zu können. Für gewöhnlich ist die Demonstration der beobachteten polarisationsoptischen Erscheinungen ohne Korrekturen auf photographischem Wege möglich. Bei den hier untersuchten kalottenförmigen Kolonien von Bac.circulans bringt jedoch die häufig gut ausgeprägte Eigenbeweglichkeit der Kolonien und dabei insbesondere ihre Eigenart, um die eigene Achse zu rotieren, eine Schwierigkeit für ihre photographische Demonstration mit sich. Da sich die Belichtungszeiten auch im günstigsten Falle nicht unter 45 Sekunden herabdrücken lassen, ist die resultierende Aufnahme einer rasch auf der Stelle rotierenden Kolonie (Abb.2) eine Summierung der verschiedenen Bewegungsmomente, in welchen sich die Kolonie während der Zeit von O bis 45 Sekunden befindet. Eine wirkliche Momentaufnahme solcher rotierenden Kolonien ist nur zu erreichen, wenn sie ihre Eigenbeweglichkeit vollkommen eingestellt haben. Am besten ist das dadurch herbeizuführen, daß sie rasch abgekühlt werden. Hier wurde dies im wesentlichen dadurch erreicht, daß wir die Kolonien durch Gefriersubstitution innerhalb von etwa lo Sekunden in ihrer Eigenbeweglichkeit unterbrachen und diesen Zustand durch die nachfolgende Fixierung stabilisierten. Der Vergleich der Bilder vor (Abb.4a) und nach einer solchen Behandlung (Abb.4b) zeigt, daß eine Homogenität der Lichtintensitäten in den einzelnen polarisationsoptisch in Erscheinung tretenden Feldern in den Aufnahmen von rasch rotierenden kalottenförmigen Kolonien (Abb.2a und 4a) nur vorgetäuscht wird. Hinzu kommt noch, daß bei der Verwendung von Objektiven kleiner Maßstabzahlen durch größere Tiefenschärfe solcher optischen Systeme zusätzlich Homogenität vorgetäuscht werden kann. In der Abb.9 ist der Mittelpunkt einer nichtrotierenden kalottenförmigen Kolonie nach Gefrier-

substitution wiedergegeben: Es ist dieselbe Kolonie wie in den Abb.4a und b: Die in der Abb.4b noch gleichmäßig aufgehellten bzw. dunklen Bezirke lassen bei der Aufnahmetechnik der Abb. 9 erkennen, daß in diesen Bezirken v o r w i e g e n d Helligkeit bzw.Dunkelheit herrschen. In welchem Umfang hierfür durch die Technik der Gefriersubstitution bedingte Artefakte eine Rolle spielen können, läßt sich nicht exakt angeben, da über die Wärmeleitfähigkeit von Kolonie und Agar keine Untersuchungen angestellt wurden. Es ist jedoch anzunehmen, daß dieser technische Fehler bei diesen Beobachtungen von geringer Bedeutung ist, denn schon bei Temperaturen von +15°C ist an den Bakterienkolonien Eigenbeweglichkeit nicht mehr feststellbar.
Nach der polarisationsoptischen Untersuchung von Kolonien lag es nahe, das polarisationsoptische Verhalten von Einzelkeimen zu untersuchen. Zu diesen Versuchen kann festgestellt werden: Die polarisationsoptische Untersuchung einzelner Bakterien ist erschwert bzw. unmöglich durch das Auftreten von unspezifischen polarisationsoptischen Beugungserscheinungen, deren Wirkungsgrad von den Abmessungen der Einzelkeime, insbesondere der Dicke, abhängig ist. Dagegen läßt sich die polarisationsoptische Wirkung abnorm großer Keime, wie sie zu Beginn der Koloniebildung auftreten können, beschreiben.

Nachdem durch systematische Versuche ausgeschlossen werden konnte, daß Bestandteile des Nährbodens durch Anreicherung zwischen den Einzelkeimen einer Bakterienkolonie als Ursache für das Auftreten der polarisationsoptischen Erscheinungen der Kolonie von Bac.circulans infrage kommen, reduzierte sich die Frage nach der Herkunft des oben als "Substanz C" bezeichneten Stoffes und nach seiner Beziehung zur Bakterienzelle auf drei Möglichkeiten, die hier diskutiert werden sollen:

1. Bei der "Substanz C" handelt es sich um ein in die Umgebung von den Keimen abgesondertes Material.

2. Die polarisationsoptisch wirksame "Substanz C" ist als Bestandteil der Bakterienzellwand aufzufassen, z.B. als "Mikrokapseln".

3. Anhangsgebilde der Bakterien stellen das Ausgangsmaterial des extrahierten Stoffgemisches dar.

Die Ergebnisse der Deckglasfixation und die ersten Schritte des angewandten Extraktionsverfahrens lassen den Schluß zu, daß es sich bei dem für die spezifischen polarisationsoptischen Erscheinungen verantwortlichen Stoff entweder um lose auf der Bakterienoberfläche haftendes Material oder um ein zwischen den Einzelkeimen befindliches und von diesen abgesondertes Produkt handelt. Wenn die "Substanz C" lediglich ein Stoffwechselprodukt der Bazillen wäre, welches unmittelbar nach seiner Entstehung ausgeschieden wird, hätte man keine Erklärung für die polarisationsoptischen Erscheinungen der Abb.10, die Langformen von Bac.circulans zeigt. Aus der Abb.10 scheint vielmehr hervorzugehen, daß die "Substanz C" in einer gewissen Beziehung zur Morphologie der Bakterienzelle steht.

KLECZKOWSKI, NORMAN und SNIETZKO (42) isolierten 1940 einen Keim aus der Erde, dem sie zunächst den Namen B.Kreczeminiewski gaben und der später von SMITH et al.(77) als ein Stamm von Bac.circulans identifiziert wurde. An diesem Stamm konnten lichtmikroskopisch Kapseln nachgewiesen werden. Ihre chemische Grundstruktur wurde 1940 von KLECZKOWSKI und WIERZCHOWSKI (41) als Polysaccharid angegeben; seine Bausteine wurden als Mannan charakterisiert.

FORSYTH und WEBLEY (25) untersuchten neben diesem Stamm auch eine Reihe anderer Stämme von Bac.circulans, die ebenfalls lichtmikroskopisch nachweisbare Kapseln besaßen, auf die chemische Zusammensetzung des Kapselmaterials. Um dabei zu einer guten Ausbeute an Kapselsubstanz zu gelangen, wurden von diesen Untersuchern bestimmte Kulturbedingungen eingehalten. Das Ergebnis der chemischen Analyse der Kapsel - substanz war die Gewinnung eines Polysaccharides, das aus

den Monosacchariden Glucose, Mannose und Uronsäure be - stand, die in einem Verhältnis von 3:2:2 zueinander standen. Leider fehlt bei dieser Arbeit die Angabe, ob die untersuchten Bakterienstämme Eigenbeweglichkeit bzw.Begeißelung zeigten.
Obwohl an dem von uns untersuchten Bac.circulans-Stamm ATCC 9966 mit keiner der üblichen Nachweismethoden (WILKINSON (93)) lichtmikroskopisch Kapselmaterial beobachtet werden konnte, wurde für diese Arbeit aufgrund der Beobachtungen bei der Deckglasfixation von Bakterienkolonien in den wesentlichen Punkten das ganz auf die Darstellung von Polysacchariden abgestimmte Extraktionsverfahren von FORSYTH und WEBLEY (25) übernommen. Dabei wurde von der Hypothese ausgegangen, daß bei dem untersuchten Stamm ATCC 9966 die polarisationsoptisch wirksame Substanz möglicherweise in Form von lichtmikroskopisch nicht ohne weiteres nachweisbaren Mikrokapseln, so wie sie von WILKINSON (93) definiert worden sind, vorliegen könnte. In Analogie zu den Befunden von TOMCSIK (82,83), IVANOVICS und HORVATH(4o), LABAW und MOSLEY (45), könnte auch an Kapseln gedacht werden, die das Bakterium nicht überall an seiner Oberfläche gleichmäßig umhüllen. Für diese Annahmen sprachen:

1. Die ungleich größere Menge an Ausgangsmaterial, das wir im Gegensatz zu den Angaben von FORSYTH und WEBLEY benötigten, um zur Extraktion einer kleinen Menge an "Substanz C" zu gelangen.

2. Die schon erwähnten Beobachtungen bei der Deckglasfixation: Es mußte danach unwahrscheinlich erscheinen, daß allein der Verdampfungseffekt alkoholischer Medien in der Lage sein sollte, den größeren Teil der Bakteriengeißeln oder Filamente loszureßen und fortzuschwemmen.

3. Die Ergebnisse der Brechzahlbestimmung lebender Keime mit Hilfe wässeriger Albuminlösungen: Verschwinden der "polarisationsoptischen Erscheinun-

gen" nach mehrfachen Mediumwechsel, möglicherweise hervorgerufen durch Herauslösung der polarisationsoptisch wirksamen Komponente von der Bakterienoberfläche.

4. Das von FORSYTH und WEBLEY (25) abweichende Endergebnis der Extraktion: Die Zugehörigkeit der "Substanz C" zur Gruppe der Glycoproteine. Die Kapseln von Bac.anthracis bestehen ebenfalls aus Glycoproteinen (TOMCSIK (82)) und bei ihrer polarisationsoptischen Untersuchung (GILLERT (34)) zeigten sie ähnliche polarisationsoptische Erscheinungen in Abhängigkeit von der Lage der Bakterienlängsachse zu den Schwingungsrichtungen der Polarisations-Filter wie Bac.circulans.

Eine Möglichkeit zu prüfen, ob die "Substanz C" in Form von Mikrokapseln organisiert ist, könnten serologische Versuche mit der gereinigten Substanz bieten, wie von von TOMCSIK (84), DUGUID (21), WILKINSON et al.(92) und GUEX-HOLZER und TOMCSIK (37) an verschiedenen anderen Bakterienstämmen durchgeführt worden sind: Hier wurde durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion eine Schwellung des Kapselmaterials erreicht und damit der lichtmikroskopische Nachweis möglich.

Da die Kristallisationsprodukte aus der wässerigen Lösung der "Substanz C" drei verschiedene Kristalltypen erkennen ließen - kubische, astroide und nadelförmige Kristallite - muß erwogen werden, ob die von uns isolierte "Substanz C" nicht nur aus einem sondern zumindest aus zwei Stoffkomponenten bestehen könnte. Andererseits können schon geringste Verunreinigungen Unregelmäßigkeiten der Kristallbildung hervorrufen.
Diese Überlegungen sind im Hinblick auf das hier angewandte Extraktionsverfahren wichtig, da rückblickend dieses Extraktionsverfahren zusätzlicher Sicherungen bedarf; dies betrifft insbesondere zwei Abschnitte der beschriebenen Methodik:

1. Die Gewinnung des Ausgangsmaterials: Neben der Suspendierung der Einzelkeime werden Bestandteile des Agar-Nährbodens mitgelöst.

2. Die Gewinnung des Rohproduktes aus der Bakteriensuspension: Durch das Ausschütteln werden Zellorganellen losgerissen, die bei der am Schluß des Verfahrens durchgeführten Sterilfiltration nicht zurückgehalten werden.

Die erste Möglichkeit erscheint uns von geringerer Bedeutung, weil das Abschwemmen der Keime einerseits mit einer sehr kleinen Flüssigkeitsmenge erfolgt und andererseits dieser Vorgang so rasch ablaufen kann, daß ein längerer Kontakt des Suspensionsmediums mit der Agaroberfläche vermieden werden kann.
Dagegen ist ungewiß, ob die Zentrifugalkräfte unter den beschriebenen Bedingungen ausreichten, neben der Masse der Bakterienkörper auch eventuell abgerissene Zellorganellen, z.B. Geißeln, zu sedimentieren. Dasselbe gilt für die den Extraktionsgang abschließende Sterilfiltration. Deshalb wäre es wünschenswert gewesen, analog den Präparations - techniken zur Gewinnung von Bakteriengeißeln (WEIBULL (33-33)) nach Punkt c) des Extraktionsschemas eine Aufarbeitung in einer Ultrazentrifuge anzuschließen; darauf mußte jedoch aus technischen Gründen bei dieser Arbeit verzichtet werden. Eine weitere Verbesserung könnte ebenso erreicht werden, wenn über eine Gel-Filtration eine weitere Reinigung oder Auftrennung versucht werden könnte. Letzteres konnte bisher nur in geringem Umfang durchgeführt werden; zufriedenstellende Resultate liegen noch nicht vor.

Für Strukturuntersuchungen verwendet man immer dann polarisationsoptische Untersuchungen, wenn das Untersuchungsobjekt durch die Methodik möglichst wenig verändert werden soll. Jedoch sind die Ergebnisse solcher polarisations - optischen Beobachtungen umso schwerer zu deuten, je komplizierter das Untersuchungsobjekt aufgebaut ist.
Im vorliegenden Fall des Auftretens polarisationsoptischer

Phänomene bei Bakterienkolonien des Bac.circulans ist es erst, wenn man weiß, wo die polarisationsoptisch wirksame Substanz am Bakterium zu suchen ist möglich, direkt von diesen Erscheinungen auf die Struktur der Bakterienkolonie, gemeint ist die Anordnung der Einzelkeime innerhalb des Kolonieverbandes, zu schließen. Denn das E i n z e l b a k t e r i u m ist T r ä g e r der polarisationsoptisch wirksamen Komponente. Außerdem ist eine weitergehende polarisationsoptische Charakterisierung der "Substanz C", vor allem die Beziehung ihrer optischen Achsen zu einem charakteristischen Parameter der Bakterienzelle, z.B. der Längsachse, nötig, um auf die Anordnung der Einzelzelle innerhalb der Kolonie Rückschlüsse ziehen zu können.

Die polarisationsoptischen Kolonie-Bilder können sowohl als ein Sonderfall von Strömungsdoppelbrechung als auch von Aggregationsdoppelbrechung (z.B. der von SCHMIDT (72) an Paraffinkristallen beschriebenen Aggregationsdoppelbrechung) aufgefaßt werden. Allerdings können so eindeutige Aussagen, wie sie bei mineralogischen Untersuchungsobjekten oder bei polarisationsoptischen Untersuchungen von chemisch definierten biologischen Materialien, z.B.Kollagen, möglich waren, im Hinblick auf die komplizierte Koloniestruktur (erinnert sei an die Befunde bei ruhenden Bakterienkolonien, betrachtet unter höherer mikroskopischer Vergrößerung) und den komplexen Aufbau des Einzelkeimes nicht erwartet werden.

Die Bedeutung der Polarisationsmikroskopie als Verfahren zur Untersuchung von Bakterienkolonien läßt sich demnach wie folgt umreißen:

1. Qualitative Ergebnisse polarisationsoptischer Erscheinungen an makroskopischen Objekten (Kolonien) können erbracht werden.
   Dagegen sind quantitative Untersuchungen nur sinnvoll, wenn es gelingt:

2. den polarisationsoptisch wirksamen Bestandteil in genügender Menge darzustellen, und wenn es möglich ist
3. unter Zuhilfenahme anderer Untersuchungstechniken den morphologischen Bezug zwischen polarisationsoptisch wirksamen Bestandteilen und Bakterien herzustellen.

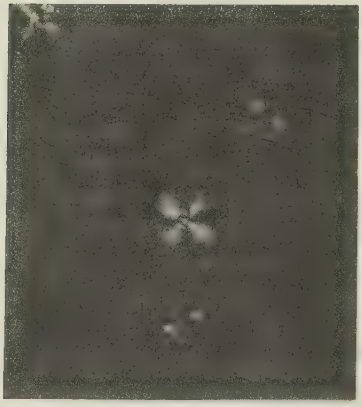
Das in der Antibiotika-Therapie einige Zeit verwendete Circulin wurde aus Kulturlösungen von Bac.circulans gewonnen. Einige Parallelen der angegebenen Extraktionsverfahren (2o) und der hier beschriebenen Methodik zur Gewinnung der "Substanz C" lassen an eine Identität dieser beiden Stoffe denken. Innerhalb dieser Arbeit wurde jedoch darauf verzichtet, die "Substanz C" auf möglicherweise vorhandene antibiotische Eigenschaften zu unter - suchen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die unter bestimmten Bedingungen gezüchteten Kolonien von Bacillus circulans im lebenden und fixierten Zustand im linear polarisierten Licht untersucht. Die hierbei zu beobachtenden polarisationsoptischen Erscheinungen werden beschrieben. Sie lassen den Schluß zu, daß es sich um Erscheinungen handelt, denen optisch positive Anisotropie der Bakterienkolonien zugrunde liegt.

Die polarisationsoptische Untersuchung von Einzelkeimen gelingt nur an Langformen der untersuchten Keimart, welche während der logarithmischen Wachstumsphase auftreten. Die polarisationsoptischen Phänomene dieser Langformen werden beschrieben. Eine weitergehende polarisationsoptische Charakterisierung gelingt nicht.
Bei der Behandlung der kalottenförmigen Kolonien von Bacillus circulans mit verschiedenen Fixationslösungen zeigen sich die zuvor beobachteten polarisationsoptischen Erscheinungen als an einen in den Bakterienkolonien befindlichen Stoff gebunden. Vorversuche ergeben, daß dieser Stoff aus der Kolonie extrahiert werden kann. Es folgt die Erarbeitung eines Extraktionsganges, und es gelingt, ein kristallähnliches Material zu gewinnen. Die polarisationsoptische Untersuchung der verschiedenen Kristallite zeigt, daß es sich hierbei um optisch zweiachsige Kristalle mit stumpfen Achsenwinkeln handelt; die Ergebnisse der durchgeführten chemischen Untersuchungen ergeben die Zugehörigkeit dieses Materials zu den Glycoproteinen. Die möglichen morphologischen Beziehungen dieses poralisationsoptisch wirksamen Glycoproteins zum Einzelkeim werden diskutiert.

Abbildungen



a

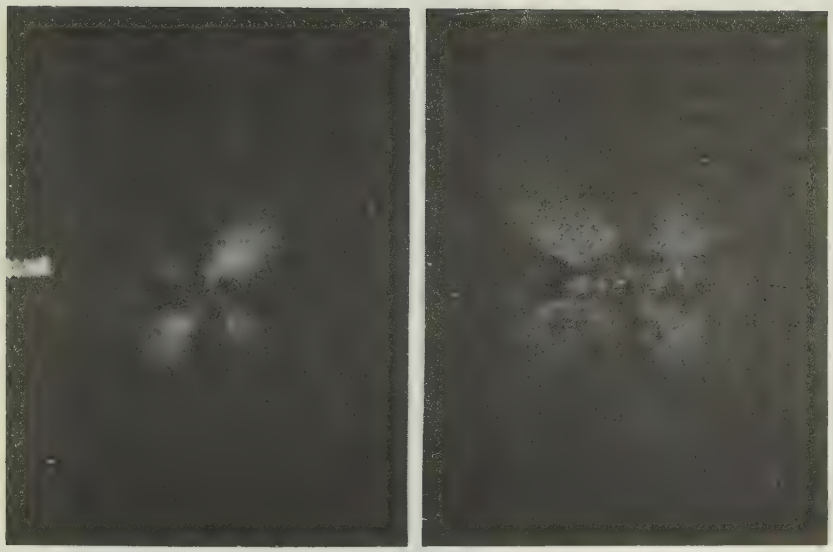
b

c

Abb.1: Demonstration der polarisationsoptischen Wirkung des Untergrundes (Agar) auf das polarisationsoptische Bild von kleinen, ruhenden kalottenförmigen Kolonien von Bac circulans unter verschiedenen Azimuten.

a) 0^{o}
b) 45^{o}
c) 90^{o}

Objektiv:Achromat 10/0,22 "Pol"Z, Okular:Kpl.-Fadenkreuz-Okular 8 x "Pol", gekreuzte Polarisationsfilter, Lichtquelle: HBO 200 Filmmaterial: Grafic-Negativ-Planfilm (9x12)



a b

Abb.2: Kalottenförmige Kolonie von Bac.circulans vor und nach dem Auflegen eines Deckglases auf die Kolonie
a) rasch auf der Stelle rotierende Kolonie
b) dieselbe Kolonie nach dem Auflegen des Deckglases.

Objektiv: Achromat 10/0,22 "POL"Z, Okular: Kpl. Fadenkreuz-Okular 8x "POL", Optovar: 2x, gekreuzte Polarisationsfilter, Lichtquelle: HBO 200
Filmmaterial: Grafic-Negativ-Planfilm (9x12).

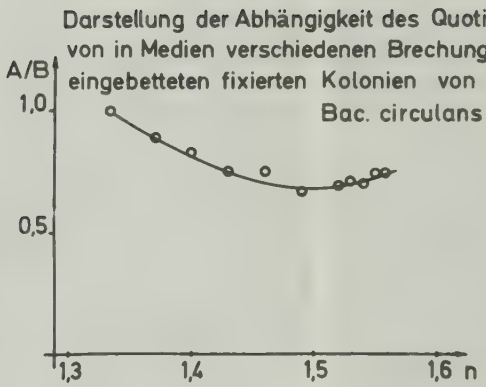
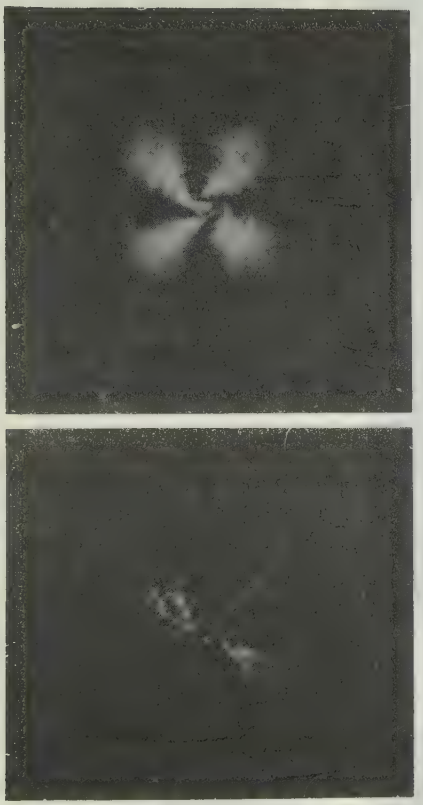


Abb.3: Das polarisationsoptische Verhalten von fixierten kalottenförmigen Kolonien nach der Durchtränkung mit Medien verschiedener Brechzahlen (Tab.1), dargestellt in dem Verhältnis des Quotienten A/B zum Brechungsindex des Imbibitionsmediums.



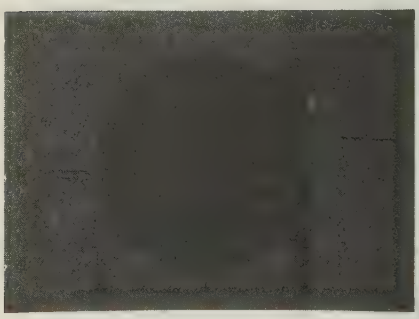
a

b

Abb.4: Rasch auf der Stelle rotierende kalottenförmige Kolonien von Bac.circulans vor und nach Fixation.
a) kalottenförmige Kolonie unfixiert
b) dieselbe Kolonie nach ihrer Fixierung.

Objektiv: Achromat 10/0,22 "POL", Optovar: 2x, gekreuzte Polarisations-Filter, Lichtquelle: HBO 200.
Filmmaterial: Grafic-Negativ-Planfilm (9x12).

a



b

c

Abb.5: Das polarisationsoptische Verhalten von fixierten Bakterienkolonien

a) fixiert in Carnoy
b) fixiert in 1o% neutralem gepuffertem Formalin
c) fixiert in ges.Phosphorwolframsäure in 7o% Äthanol.

Objektiv: Achromat 10/0,22 "POL"Z, Okular: Kpl.-Fadenkreuz-Okular 8x "POL", Optovar 2x, gekreuzte Polarisations-Filter, Hilfsobjekt Gips Rot I.Ordnung, Lichtquelle: HBO 200 Filmmaterial: Color-Planfilm (Kunstlicht) (9x12).

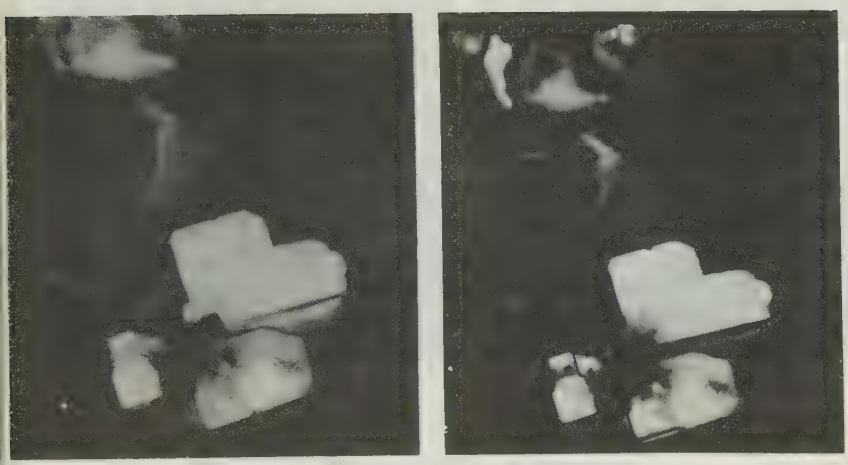
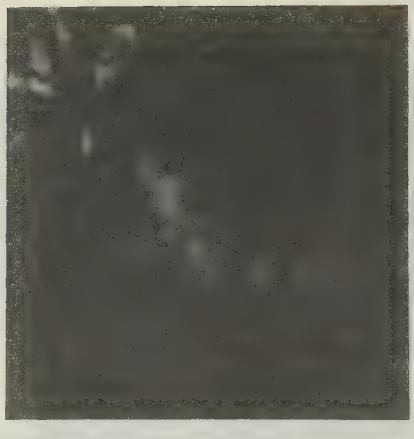


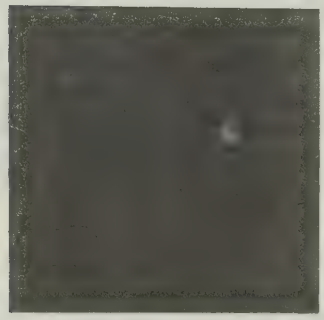
Abb.8: Das polarisationsoptische Bild der verschiedenen Kristallformen bei Beobachtung mit und ohne Hilfsobjekt Gips Rot I.Ordnung.

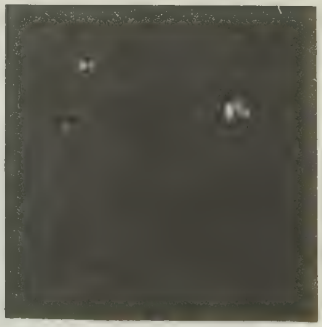
a) Kubische Kristalle
b) Astroide Kristalle
c) Kleine kubische Kristalle aus dem Zentrum
d) Nadelförmige Kristalle aus dem Zentrum

Objektiv: Achromat 100/1,25 Oel "POL"Z,
Okular: Kpl.-Fadenkreuz-Okular 8x "POL",
Optovar 2x, gekreuzte Polarisations-Filter,
(Hilfsobjekt Gips Rot I.Ordnung),Lichtquelle: HBO 200
Einbettungsmedium: Diatex/Caedax n_{20} o 1,53
Filmmaterial: Color-Planfilm (Kunstlicht) (9x12)

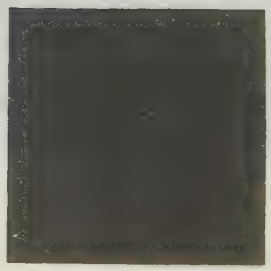


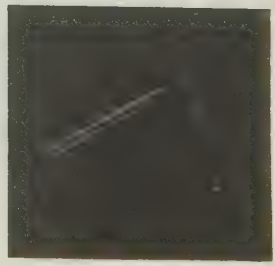
b





c





d

Spot-Test zum Nachweis von
Aminosäuren auf Dünnschichtplatten

Spot-Test zum Nachweis von
Monosacchariden auf Dünnschichtplatten

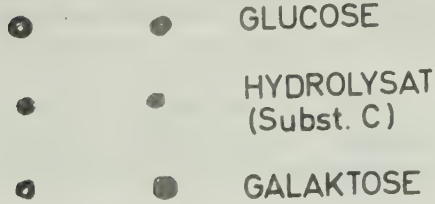
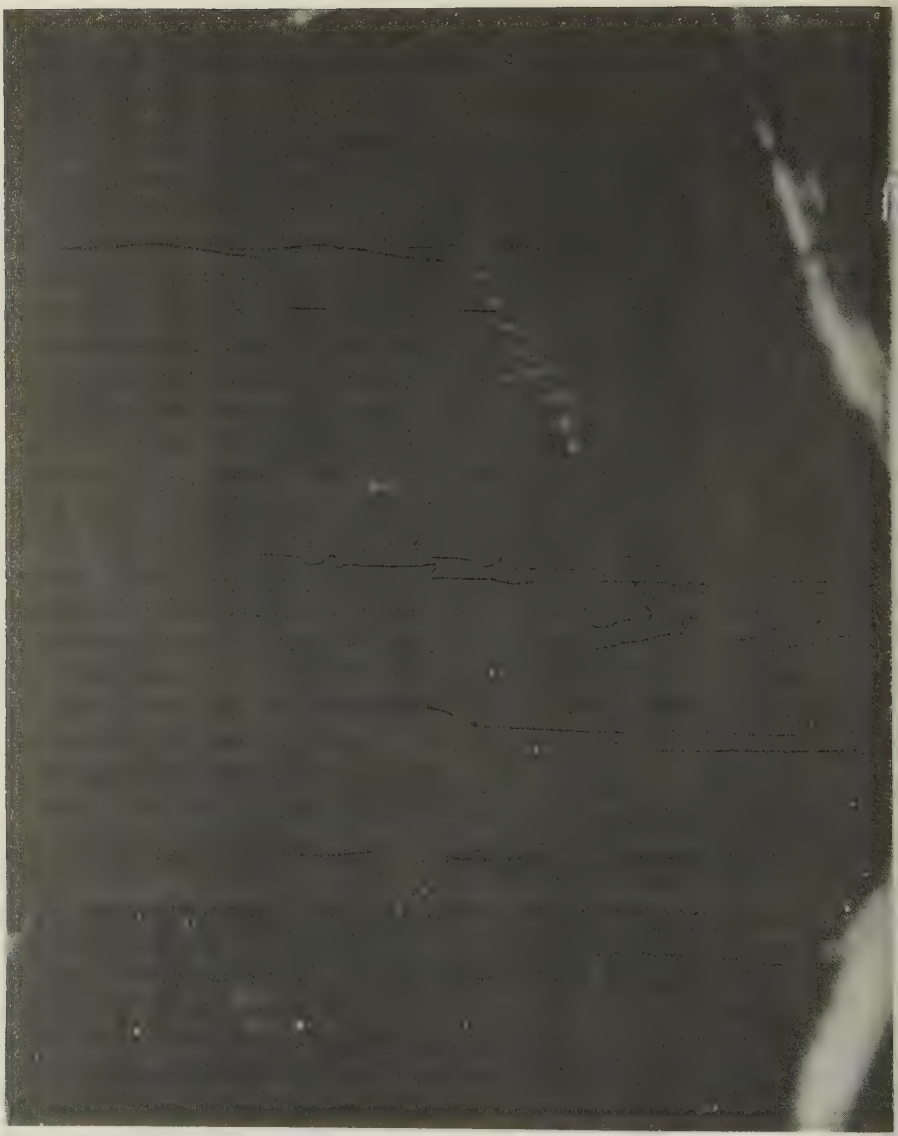


Abb.7: Ergebnisse der Spot-Teste zum Nachweis freier Aminosäuren und von Monosacchariden aus der hydrolysierten "Substanz C".

Abb.8: Aufgetrennte Aminosäure-Fraktionen (dünn - schichtchromatographisch) aus dem Hydrolysat der "Substanz C" und Kontrollsubstanzen Histidin und Arginin.

Abb.9: Vergrößerter Ausschnitt des Mittelpunktes der Kolonie der Abb.4b.

Objekt: Achromat 40/0,85 "POL"Z, Okular:Kpl.-Fadenkreuz-Okular 8x "POL", Optovar 2x, gekreuzte Polarisations-Filter, Lichtquelle: HBO 200, Filmmaterial: Grafic-Negativ-Planfilm (9x12).



a

Abb. 10a,b,c: Lebende Langformen von Bac.circulans suspendiert in physiologischer Kochsalzlösung.
Objektiv:Achromat 100/1,25 Oel"POL"Z,
Okular:Kpl.-Fadenkreuz-Okular 8x POL",
gekreuzte Pol.-Filter,Lichtquelle HBO 200
Filmmaterial:Grafic-Negativ-Planfilm (9x12)
Nachvergrösserung: 10x

b

c

LITERATURVERZEICHNIS

1. AMANN,J.
Pleochroismus gefärbter Bakterienzellen
Zentralbl.f.Bakt. 13, 775-78o (1893)

2. AMBRONN,H.
Anleitung zur Benutzung des Polarisationsmikroskopes bei histologischen Untersuchungen
Leipzig 1892

3. AMBRONN,H.
Über die optischen Eigenschaften sehr enger Spalten
Ann.d.Phys.u.Chem. 48, 717-722 (1893)

4. AMBRONN,H.
Über Farberscheinungen an den Grenzen farbloser Objekte im Mikroskop
Ber.Leipz.Ges.d.Wiss. 48, 134-14o (1896)

5. AMBRONN,H.
Über die akzidentelle Doppelbrechung im Zelloidin und in der Zellulose
Nachr.Ges.Wiss.Göttingen, Math.-phys.Kl. S.317 (1919)

6. AMBRONN,H. und A.FREY
Das Polarisationsmikroskop
Leipzig 1926

7. ASTBURY,W.T., T.C.MARWICK and J.D.BERNAL
X-ray analysis of the structure of the wall of Valonia
Proc.R.Soc. 1o9, 443-45o (1932)

8. ASTBURY,W.T.
Fundamentals of fibre structure
London 1933

9. ASTBURY,W.T.
The x-ray interpretation of fibre structure
J.Soc.of Dyers and Colorits, Bd.49,169-179 (1933)

10. BARER,R. and S.JOSEPH
Refractometry of living cells.
Part I. Basis principles
Quart.J.of Microscop.Sc. 95, 399-423 (1954)

11. BARTELS,P.H.
Optical methods for the analysis of orientation of biological structures
in: Introduction to quantitative cytochemistry
ed. G.L.Wied, New York 1966, S.519-538

12. BARTHOLIUS,E.
Experimenta crystalli Islanici disdiaclastici, quibus mira et insolita refractio detegitur
Kopenhagen 1669

13. BOEHM,G.
Methodik der Untersuchung der Strömungsdoppelbrechung
Handbuch d.biolog.Arbeitsmethoden
ed.A.Abderhalden, II.Abt.Teil 3, 3939-4004 (1932)

14. BREWSTER,D.
On the affections of light transmitted through cristallized bodies
Trans.roy Soc.London 104, 187-218 (1814)

15. BREWSTER,D.
Experiments of the depolarization of light as exhibited by various mineral, animal, and vegetable bodies, with a reference of the phenomena to the general principles of polarisation
Phil.Trans.roy Soc.London, 105, 29-33 (1815)

16. BRILL,R.

Über die Bestimmung von Größe und Gestalt submikroskopischer Kristalle mit Röntgenstrahlen

Koll.Z. 55, 164-169 (1931)

17. BRILL,R.

Über röntgenographische Bestimmung von Größe und Form submikroskopischer Kristalle

Ergebn.techn.Röntgenk. II., 115-126 (1931)

18. BRÜCKE,E.

Die Elementarorganismen

Sitzungsber.Akad.Wiss.Wien, Math.Naturwiss.Kl.II 44, 381-403 (1861)

19. BURRI,C.

Das Polarisationsmikroskop

Basel 1950

20. Die Antibiotica

Verlag Hans Karl Nürnberg 1965
ed.K.Brumer und G.Machek, S.235-269

21. DUGUID,J.P.

The demonstration of bacterial capsules and slime

J.Pathol.Bacteriol. 63, 673-685 (1951)

22. EBNER,v.,V.

Untersuchungen über die Ursachen der Anisotropie organisierter Substanzen

Leipzig 1882

23. EHRENBERG,F.

Über eine neue einflussreiche Anwendung des polarisierten Lichtes für mikroskopische Auffassung des Organischen und Anorganischen. Erste Mitteilung: Die Anwendung auf die kleinsten Organismen und die biolithischen Kiesel-und Kalk-Gebirgsarten

Ber.Verh.preuss.Akad. Berlin 238-247 (1840)

24. EHRENBERG,F.
Weitere Mitteilungen über Resultate bei Anwendung des chromatisch polarisierten Lichtes für mikroskopische Verhältnisse
Ber.Verh.preuss.Akad. Berlin, 55-76 (1849)

25. FORSYTH,W.G.C. and D.M.WEBLEY
Polysaccharides synthesized by mesophilic spore-forming bacteria
Biochem.J. 44, 455-459 (1949)

26. FREY,A.
Doppelbrechung der Dispersoide
Kolloidchem.Beihefte 2o, 2o9-243 (1924)ü

27. FREY,A.
Der heutige Stand der Micellartheorie
Ber.Deutsch.bot.Ges. 44, 534-57o (1926)

28. FREY,A.
Das Reich des Ultramikroskopischen in der Biologie
Protoplasma 4, 139-154 (1928)

29. FREY-WYSSLING,A.
Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate
Protoplasma-Monographien 15, XIV, 317, Berlin 1938

30. FREY-WYSSLING,A.
Analyse der Formdoppelbrechungskurven
Koll.Z. 9o, 33-4o (194o)

31. FREY-WYSSLING,A.
Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas
Protoplasmatologia, Handbuch der Protoplasmaforschung 2, A2, 145-17o (1955)

32. GILLERT,K.E.
Aufbau und Verhalten beweglicher Kolonien
in: Enzyklopädia Cinematographica ed.G.Wolf E 183 (1958)

33. GILLERT,K.E.
Über das Verhalten von beweglichen Bakterienkolonien, dargestellt an einem Bacillus der Circulans-Gruppe
Med.Habilitationsschrift, Berlin 1961

34. GILLERT,K.E.
Polarisationsoptische Untersuchungen über die Struktur von Kolonien verschiedener Bakterienarten
Zentralbl.f.Bakt. I Orig. 189, 488-496 (1963)

35. GILLERT,K.E.
Persönliche Mitteilungen

36. GRASSBERGER,R.
Über Buttersäuregärung (3.Abhandlung)
A. Morphologie des Rauschbrandbazillus und Ödembazillus
Arch.Hyg. 48, 1-76 (1904)

37. GUEX-HOLZER,S. and J.TOMCSIK
The isolation and chemical nature of capsular and cell-wall haptens in a Bacillus species
J.Gen.Microbiol. 14, 14-25 (1956)

38. HALLIMOND,A.F.
Manual of the Polarizing Microscope
York 1953

39. HENNEBERG,G. und R.MARWITZ
Über die Struktur von Bakterienkolonien
Zbl.f.Bak. I.Abt.Ref. 187, 497-522 (1963)

40. IVANOVICS,G. and S.HORVATH
The structure of the Capsule of B.megatherium
Acta Physiol.Acad.Sci.Hung. 4, 175-186 (1953)

41. KLECZKOWSKI,A. and P.WIERZCHOWSKI

Experiments on the chemical nature and properties of the polysaccharide produced by Bacillus Krzemieniewski N.SP

Soil Sci. 49, 193-195 (1940)

42. KLECZKOWSKI,A.,S.NORMAN, P, SNIEZKO

Bacteriological studies on a new capsulated Bacillus, Bacillus Krzemieniewski

Soil.Sci. 49, 185-190 (1940)

43. KÖHLER,A.

Die Verwendung des Polarisationsmikroskops für biologische Untersuchungen

Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden ed.E.Abdehalden, Abt.II Teil 2, (1923)

44. KOLTZOFF,N.K.

Physikalisch-chemische Grundlagen der Morphologie

Biol.Zentralbl. 48, 345-369 (1928)

45. LABAW,L.W. and V.M.MOSLEY

Demonstration of striated fibers in the Capsule of the lisbonne Strain of lysogenic Escherichia coli

J.Bacteriol. 67, 573-584 (1954)

46. MALUS,E.L.

Mémoire sur l'axa de réfraction des cristaux et des substances organisées

J.de physique etc. 73, 193-200 (1811)

47. MEYER,K.H.

Über Feinbau, Festigkeit und Kontraktilität tierischer Gewebe

Biochem.Z. 214, 253-281 (1929)

48. MEYER,K.H.

Neue Wege in der organischen Strukturlehre und in der Erforschung hochpolymerer Verbindungen

Z.angew.Chemie 41, 935-943 (1928)

49. MEYER,K.H.

Die neueren Erkenntnisse vom Bau der großen Moleküle gewähren uns Einblick in Bau und Funktion tierischer Gewebe

Umschau, 33.Jahrg. Heft 2o, 381-383 (1932)

50. MOSBACHER,R.

Zur Kennzeichnung der grundlegenden Beobachtungsmethoden in der Polarisationsmikroskopie

Z.wiss.Mikrosk. 33, 72-85 (1953)

51. NÄGELI,C.

Die einschlägigen Arbeiten wurden von A.Frey neu herausgegeben
in: Ostwald's Klass.exakt.Naturwiss. Nr.227, Leipzig 1928

52. PFEIFFER,H.H.

Das Polarisationsmikroskop als Messinstrument in Biologie und Medizin

Braunschweig 1949

53. RHUMBLER,L.

Foraminiferen aus dem Meersand von Helgoland, gesammelt von A.Remane

Kieler Meeresforschung 2, 157-222 (1938)

54. RINNE-BERAN

Anleitung zu optischen Untersuchungen mit dem Polarisationsmikroskop
zweite völlig umgearbeitete Auflage von M.Berek, Herausgegeben von C.H.Claussen, A.Driesen und S. Rösch

Stuttgart, E.Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (E.Nägele) 1953

55. ROUGET,Ch.

Sur les phénomènes de polarisation qui s'observent dans quelques tissues des végétaux et des animaux et en particulier dans le tissue musculaire

J.Physiol. 5, 247-271 (1862)

56. RUSS-MÜNZER,A.

Über einen eigenartigen Bewegungstypus schwärmender Bakterien

Zbl.Bakt. I Orig. 142, 175-178 (1938)

57. SALTON,M.R.J. and R.W.HORNE

Studies of the bacterial cell wall
II.Methods of preparation and some properties of cell walls

Biochim. et biophys. acta 7, 177-197 (1951)

58. SCHMIDT,W.J.

Die Ergebnisse der Naegelischen Micellarlehre bei der Erforschung des Organismus

Naturwiss. 16, 900-903 (1928)

59. SCHMIDT,W.J.

Der submikroskopische Bau der tierischen Gewebe, erschlossen aus der Polarisationsoptik

Arch.exp.Zellf. 6, 350-366 (1928)

60. SCHMIDT,W.J.

Ermittlung der Grundtextur von Gelen an Hand der Doppelbrechung

Kolloid.Zeitschr. 96, 135-147 (1941 b)

61. SCHMIDT,W.J.

Neuere polarisationsoptische Arbeiten auf dem Gebiete der Biologie

Protoplasma 34, 237-313 (1940)

62. SCHMIDT,W.J.

Polarisationsoptische Erforschung des submikroskopischen Baus tierischer Zellen und Gewebe. Der experimentelle Weg und einige Beispiele

Verh.Dtsch.Zool.Ges. 303-389 (1939)

63. SCHMIDT,W.J.

Neuere polarisationsoptische Arbeiten auf dem Gebiet der Biologie

Protoplasma 29, 300-312 und 435-437 (1938)

64. SCHMIDT, W.J.

Polarisationsmikroskopische Analyse des submikroskopischen Baues von Zellen und Geweben

Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden ed. E.Abderhalden, Abt.V, Teil 1o, 453-66o (1934 a)

65. SCHMIDT, W.J.

Bestimmung der Lage der optischen Achse in Biokristallen

Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden ed. A.Abderhalden Abt.V, Teil 2/2.Hälfte 1357-14oo (1932)

66. SCHMIDT, W.J.

Dichroitische Färbungen tierischer und pflanzlicher Gewebe

Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden ed. A.Abderhalden Abt.V, Teil 2/2.Hälfte 1835-1924 (1932)

67. SCHMIDT, W.J.

Der submikroskopische Bau der tierischen Gewebe, erschlossen aus der Polarisationsoptik

Arch.exp.Zellf. 6, 35o-366 (1928)

68. SCHMIDT, W.J.

Die Bausteine des Tierkörpers in polarisiertem Lichte

Bonn 1924

69. SCHMIDT, W.J.

Neure polarisationsoptische Untersuchungen auf dem Gebiete der Biologie

Protoplasma 37, 86-153 (1942)

70. SCHMIDT, W.J.

Der Wandel der optischen Anisotropie bei topochemischen Reaktionen histologischer Strukturen

Ber.Oberhess.Ges.Natur-u.Heilkunde Giessen, N.F.Naturwiss.Abt. 23, 56-85 (1947 a)

71. SCHMIDT,W.J.

Instrumente und Methoden zur mikroskopischen Untersuchung optisch anisotroper Materialien mit Ausschluss der Kristalle

in: Handbuch der Mikroskopie in der Technik Hrsg.Freund,H., 149-315 (1958)

72. SCHMIDT,W.J.

Anwendung der Polarisationsmikroskopie in der Histochemie

in: Handbuch der Histochemie ed.Graumann,W. und K.H.Neumann, Bd.1, 1.Teil, 171-191 (1958)

73. SCHMIDT,W.J.

Die Erforschung molekularer Texturen tierischer Zellen und Gewebe an Hand der Polarisationsoptik

Nova Acta Leopold.N.F. 17, 497-516 (1955 c)

74. SCHMIDT,W.J.

Einiges über die Polarisationsoptik von Proteinstrukturen

Acta histochemica 4, 175-192 (1957)

75. SCHMITT,F.O.

Optical studies of the molecular organization of living systems

J.applied Physics 9, 1o9-117 (1938)

76. SCHMITT,F.O.

The ultrastructure of protoplasmic constituents

Physiol.Rev. 19, 27o-3o2 (1939)

77. SMITH,N.R., R.E.GORDON, F.E.CLARK

Aerobic mesophilic spore forming Bacteria

U.S.Dept.Agric.Misc.Publications n 559 (1946)

78. STAUDINGER,H.

Die hochmolekularen organischen Verbindungen Kautschuk und Cellulose
Julius Springer Verl. Berlin, 54o Seiten, 1932

79. STAUDINGER,H.
Der Aufbau der hochmolekularischen organischen Verbindungen
Naturwiss. 22, 65-71 und 84-89 (1934)

80. STEINBRINK,C.
Über den heutigen Stand der Micellartheorie auf botanischem Gebiet
Biol.Zentralbl. 45, 1-19 (1925)

81. THORNBURG,W.
The form birefringence of lamellar systems containing three or more components
J.Biophysic.and Biochem.Cytol. 3, 413-419 (1957)

82. TOMCSIK,J.
Complex structure of the Bacterial Capsule in the Genus Bacillus
Experienta 7, 459-46o (1951)

83. TOMCSIK,J.
Antibiotics as indicators for bacterial surface structures
Ann.Rev.Microbiol. 1o, 213-236 (1956)

84. TOMCSIK,J.
Bacterial Capsules and their relation to the cell wall
in: Bacterial Anatomy, pp 41-67, University Press, Cambridge, England (1956)

85. VALENTIN,G.
Die Untersuchung der Pflanzen- und Thiergewebe in polarisiertem Lichte
Leipzig 1861

86. WEIBULL,C.
Some Chemical and Physico-Chemical Properties of the Flagella of Proteus vulgaris
Biochem.Biophys.Acta 2, 351-355 (1948)

87. WEIBULL,C.

Chemical and Physicochemical Properties of the Flagella of Proteus vulgaris and Bacillus subtilis. A Comparision

Biochem.Biophys. Acta 3, 378-381 (1949)

88. WEIBULL,C.

Movment of Bacterial Flagella

Nature 167, 511-516 (1951)

89. WIENER,O.

Theorie des Mischkörpers für das Feld der stationären Strömung
1.Abhandlung: Die Mittelwertsätze für Kraft, Polarisation und Energie

Abhdnlgn.d.sächs.Ges.d.Wiss.(math.-physik.Kl.) 32, 5o7-6o4 (1912)

9O. WIENER,O.

Formdoppelbrechung bei Absorption

Kolloidchem.Beihefte 23, 189-198 (1927)

91. WIENER,O.

Schliesst das Misslingen des Röntgen-Nachweises von kristallinem Bau bereits das Vorhandensein echter Doppelbrechung aus?

Kolloidchem.Beihefte 23, 198-2oo (1927)

92. WILKINSON,J.F., J.P.DUGUID, P.N.EDMUNDS

The distribution of polysaccharide production in Aerobacter and Escherichia strains and its relations to antigenic character

J.Gen.Microbiol. 11, 59-72 (1954)

93. WILKINSON,J.F.

The Extracellular Polysaccharides of Bacteria

Bacteriol.Rev. 22, 46-73 (1958)

94. Ohne Verfasser
Anfärbereagenzien für Dünnschicht und Papier-Chromatographie
E.Merck AG Darmstadt

Herrn Prof.Dr.med.K.-E. G i l l e r t
danke ich für das überlassene Thema
und die vielen fruchtbaren Diskussionen.

Herrn Dr.med.H. V o ß, Direktor und
Professor am Bundesgesundheitsamt,
danke ich für die hilfreiche Unterstützung und Überlassung eines Arbeitsplatzes.

An dieser Stelle möchte ich mich auch
bei zahlreichen Mitarbeitern der Fa.
Carl Zeiss, Oberkochen, für die fachliche Beratung bedanken.

Lebenslauf

Am 25.August 1941 wurde ich als Sohn des Technikers Johannes Otto Foitzik und seiner Ehefrau Anna geb.Cholewa in Burg geboren.

1947 - 1955 besuchte ich hier die achtklassige Volksschule und im Anschluß daran von

1955 - 1959 die Geschwister Scholl-Oberschule, an der ich das Abitur ablegte.

1959 begann ich mit den vorklinischen Semestern mein Medizin-Studium an der "Humboldt-Universität" Berlin.

1962 bestand ich an der "Humboldt-Universität" das Physikum.

1962 - 1965 studierte ich an der "Freien Universität Berlin" und legte hier

1965 das Medizinische Staatsexamen ab.

1965 - 1967 arbeitete ich in verschiedenen Krankenanstalten als Medizinalassistent. Nach den vorgeschriebenen Pflichtzeiten ging ich für die restlichen neun Monate als Medizinalassistent an das Robert-Koch-Institut.

1968 wurde ich vom Robert-Koch-Institut als wissenschaftlicher Angestellter übernommen. Ich arbeitete dabei in dem "Labor für Pathologische Histologie, Gewebezüchtung und Gelbfieberimpfstoff-Herstellung" und im "Labor für Cytomegalo-, Masern- und Röteln-Virus".

1971 ging ich als Stationsarzt auf die "Psycho-Somatische Abteilung" in das Jüdische Krankenhaus Berlin.